

Aus dem Institut für Mikrobiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die Bakterizidie von Peritonealmakrophagen
gegen *S. typhimurium* unter dem Einfluß oraler
Paramunisierung**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Schuldt
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 1983
Journal-Nr. 1157





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546623_0025

Aus dem Institut für Mikrobiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Die Bakterizidie von Peritonealmakrophagen gegen
S. typhimurium unter dem Einfluß oraler
Paramunisierung

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Schuldt
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 1983
Journal Nr. 1157

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner

Referent: Prof. Dr. E. Hellmann

Korreferent: Prof. Dr. V. von Bülow

Tag der Promotion:

22. November 1983

Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
1. EINLEITUNG	9
2. SCHRIFTTUM	12
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1. Versuchsplan	21
3.2. Material und Methoden	24
3.2.1. Vorversuche	24
3.2.2. Material	27
3.2.2.1. Bakterienstämme	27
3.2.2.2. Medien	28
3.2.2.2.1. Feste Nährmedien	28
3.2.2.2.2. Flüssige Nährmedien	28
3.2.2.2.3. Zellmedien	28
3.2.2.2.4. Lösungen	29
3.2.2.3. Versuchstiere	29
3.2.3. Methoden	29
3.2.3.1. Herstellung der Keimsuspensionen	29
3.2.3.1.1. Optische Standardisierung	29
3.2.3.1.2. Keimsuspensionen für die orale Vorbehandlung (Paramunisierung)	30
3.2.3.1.3. Salmonellensuspensionen zur i.p. Applikation (i.p. Phagozytose)	31
3.2.3.2. Paramunisierungsmodus	32
3.2.3.3. Makrophagenbakterizidietest	32
3.2.3.3.1. Medien	32
3.2.3.3.1.1. Spül- und Kulturmedium	32
3.2.3.3.1.2. Beschallmedium	33
3.2.3.3.2. In vivo Phagozytose	33
3.2.3.3.3. In vitro Bakterizidietest	33
3.2.3.3.3.1. Zellgewinnung	33
3.2.3.3.3.2. Untersuchung der bakteriziden Wirkung der Peritonealmakrophagen	35
3.2.3.3.4. Neomycinabsterbekurve (Absterbekurve der Salmonellen im zellfreien Kulturmedium)	35

	Seite
3.2.3.3.5.	Keimzählung 36
3.2.3.3.6.	Objektträgerausstrich 36
3.2.3.4.	Statistische Methoden 36
3.3. Ergebnisse	38
3.3.1.	I.p. Dosis 38
3.3.2.	Phagozytoseraten 38
3.3.3.	Ergebnisse des Bakterizidietestes 41
3.3.3.1.	Darstellung des Verlaufs der Makrophagenaktivität 42
3.3.3.1.1.	Darstellung der Kurvenverläufe des 5. Tages p.i. 42
3.3.3.1.2.	Darstellung der Kurvenverläufe des 13. Tages p.i. 45
3.3.3.1.3.	Darstellung der Kurvenverläufe des 20. Tages p.i. 47
3.3.3.2.	Zusammenfassende Darstellung der bisherigen Ergebnisse 50
3.3.4.	Entwicklung der Salmonellenzahlen in den Zentrifugationsüberständen 54
3.3.5.	Ergebnisse der Meßgenauigkeits- bestimmung 61
3.4. Besprechung der Ergebnisse	62
3.4.1.	Ergebnisse der Makrophagenaktivi- tätsbestimmung 62
3.4.1.1.	<i>Y. enterocolitica</i> 68
3.4.1.2.	<i>E. coli</i> (K_{88} positiv und K_{88} negativ) 69
3.4.1.3.	<i>L. plantarum</i> 71
3.4.1.4.	<i>S. typhimurium</i> 72
3.4.2.	Ergebnisse der Salmonellenzahlen in den Zentrifugationsüberständen 74
3.4.3.	Schlußfolgerungen 75
4. ZUSAMMENFASSUNG	79
5. SUMMARY	81
6. TABELLEN	83
7. LITERATURVERZEICHNIS	95

Verwendete Abkürzungen:

S. tm.	=	Salmonella typhimurium
K-	=	Escherichia coli, K ₈₈ negativ
K+	=	Escherichia coli, K ₈₈ positiv
Y. e.	=	Yersinia enterocolitica
L. pl.	=	Lactobacillus plantarum
N	=	Kontrollgruppe
p.i.	=	post infectionem
i.p.	=	intraperitoneal
i.v.	=	intravenös
sec	=	Sekunde
min	=	Minute
h	=	Stunde
MPS	=	mononukleäres Phagozyten System

1. EINLEITUNG

Methoden, um die körpereigene Abwehr zu beeinflussen, sind im Laufe der wissenschaftlichen Entwicklung unter verschiedenen Begriffen zusammengefaßt worden. Die Begriffe "Depressionsimmunität" - womit eine Unempfänglichkeit gegen eine Streptokokken-Superinfektion gemeint war (Depression der Virulenz eines Keimes) - und "Promunität" - ein ebenfalls kurzfristig erworbener Schutz gegen eine Superinfektion, der auch unspezifisch sein konnte - haben einige Jahre nebeneinander existiert, bis sich herausstellte, daß beide Begriffe eine erregerspezifische Infektionsabwehr des Organismus beschrieben (69).

Verschiedene Stoffgruppen, deren Wirksamkeit auf eben diesen Mechanismus empirisch erprobt wurden, sind heute noch in Gebrauch. So wird die "unspezifische Reiztherapie" mit Präparaten wie B.S.K. (Bacillus-Subtilis-Kulturfiltrat), Pro Symbiofer (Autolysat aus *E. coli* und *Str. faecalis*) oder Lachesis in Groß- und Kleintierpraxen angewendet (3, 32).

Die Zusammenfassung der Entwicklung auf dem Gebiet der nicht-erregerspezifischen, körpereigenen Abwehr mündete in der Prägung des Begriffes "Paramunisierung", der von MAYR (1982) herausgestellt wurde. Mit diesem Ausdruck wurde eine einheitliche Begriffsbestimmung für alle Medikationen geschaffen, die geeignet sind, die Abwehrlage eines Organismus zu stimulieren und so einem Individuum Schutz = Paramunität gegenüber verschiedenen Noxen (Antigenen, Toxinen, Erregern) zu vermitteln.

Die Stoffe, die für eine solche Medikation verwendet werden, die Paramunitätsinducer, werden nach ihrem Wirkungsspektrum in Inducer Typ I (= unipotenter Inducer) und Inducer Typ II unterteilt. Während zu den ersteren (Typ I) unter anderem Adjuvantien verschiedenster Art sowie bakterielle Endotoxine zählen, finden sich in der Gruppe der letzteren (Typ II) unter anderem Impfstoffe mit paraspezifischer Wirkung,



chemische Inducer (zum Beispiel Levamisol) oder multipotente Lymphokine.

Seit sich abzeichnet, daß bei infektiösen Erkrankungen die Chemotherapie nicht alle Probleme zu lösen vermag, zumal immer mehr resistente Erregerstämme auftreten, so daß auch mit Dosiserhöhungen oft keine Erfolge zu erzielen sind, rückt die Paramunisierung als Möglichkeit, "ruhende", körpereigene Abwehrkräfte zu mobilisieren, in den Vordergrund.

In diesem Zusammenhang sind auch die Forschungen RAETTIGs (1970, 1972, 1979, 1981) zu sehen, dessen Bemühungen dahin gehen, mittels oraler Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen einen Schutz gegen bakterielle Darminfektionen, speziell gegen Salmonella-Infektionen, zu erzielen. Als Grundlagen der von ihm beobachteten paraspezifischen Wirkungen der Oralimpfstoffe wird von ihm die mögliche Induktion des Interferon-Propionin-Systems (83) herangezogen; als wesentlicher Faktor wird jedoch auch die Steigerung der Phagozytoseaktivität der Makrophagen betrachtet.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen über die Möglichkeit einer Steigerung der Abwehrfähigkeit gegenüber Salmonellen wurden ebenfalls mikrobielle Immunmodulatoren gewählt; es handelte sich hier jedoch um vermehrungsfähige Keimpopulationen. Um ihre Wirksamkeit bezüglich des bakteriellen Krankheitserregers *S. typhimurium* zu überprüfen, standen zwei Testsysteme zur Auswahl:

- der Infektionsbelastungsversuch oder
- die Überprüfung der funktionellen Grundlagen der Paramunität in Gestalt der Makrophagenaktivität.

Diese Zellen spielen im Rahmen der unspezifischen Infektionsabwehr eine zentrale Rolle.

Die Wirksamkeit der hier vorgenommenen Paramunisierung im Infektionsbelastungsmodell wurde von WOHLFARTH (1983) überprüft, auf dessen Arbeit an dieser Stelle verwiesen werden soll.

Die vorliegende Studie untersuchte die Beeinflussung der Bakterizidie von Peritonealmakrophagen gegen *S. typhimurium*.

2. SCHRIFTTUM

Salmonella-Infektionen von Mensch und Tier sind in der ganzen Welt verbreitet. Der Salmonellose Herr zu werden, ist daher eine bedeutende Aufgabe sowohl der Human- als auch der Veterinärmedizin. Während beim Mensch Lebensmittelvergiftungen im Vordergrund stehen, handelt es sich bei klinisch manifesten Tiersalmonellosen meist um Jungtiererkrankungen, wobei Verluste besonders auch in der Kälbermast zu verzeichnen sind.

Da die Chemotherapie wegen des spezifischen Problems des Ausscheidertums das Salmonelloseproblem nicht zu lösen vermag, gehen die Bemühungen in Richtung der Entwicklung von Schutzimpfungsverfahren. Dabei stehen orale Immunisierungsverfahren im Vordergrund. Schon 1909 wies YOSHIDA darauf hin, daß die Art und Weise der Applikation eines Impfstoffes von großer Bedeutung für den späteren Infektionsmodus ist; das heißt, bei Erregeraufnahme per os habe die Immunisierung per os besondere Aussichten auf Erfolg. In die gleiche Richtung zielte auch die Aussage von BESREDKA (1926), daß eine optimale Immunisierung durch Vakzinierung des empfänglichen Organs zu erzielen sei, und so für die Dysenterie, Cholera und Typhus eine Enterovakzination die sicherste Immunität herbeiführe. HOF und FINGER (1974) sehen die Eignung oraler Gaben von antigentischem Material darin, daß die lymphatischen Strukturen für einen direkten Kontakt besonders geeignet sind, da die Peyer'schen Plaques und intraepithelialen Lymphknoten sehr dicht am Lumen liegen.

Grundlegende Voraussetzung für die Wirksamkeit der oralen Immunisierung ist die Möglichkeit, daß das oral verabreichte korpuskuläre Antigen durch die Dünndarmwand aufgenommen wird und in den Körper gelangt. Dies wird durch den als Persorption bezeichneten Vorgang gewährleistet. Die Persorption von Mikroorganismen im Darm ist ein regelmäßiges physiologisches Geschehen (92).

Seit 1950 ist RAETTIG darum bemüht, die orale Immunisierung mit abgetöteten Keimen in den Blickpunkt des Interesses zu rücken, zumal berechtigte Zweifel am Sinn einer parenteralen Impfung gegen überwiegend lokale Darminfektionen bestehen (109). 1976 wurden von DICKEL die Resultate RAETTIGs et al. (1972) aufgegriffen, und er erzielte mit Hilfe eines aus einem abgetöteten *S. typhimurium*-Stamm hergestellten Impfstoffes Erfolge im Kampf gegen Kälberverluste und Salmonellenausscheider.

Mit der Verwendung von Lebendimpfstoffen bei Kälbern in Form von für Kälber avirulenten *S. dublin*-Mutanten war 1980 MEYER erfolgreich. Dabei wurde in einem Bestand die Sterblichkeitsrate auf 0 % gesenkt; ebenso konnte die Ausscheiderrate signifikant herabgesetzt werden. Mit demselben Impfstoff (Bovisoral Dessau) wiesen STEINBACH et al. (1982) eine frühe Schutzphase beim Kalb sowohl gegen *S. dublin* als auch gegen *S. typhimurium* nach.

Neben den Versuchen, durch orale Gabe von homologen und heterologen Salmonellenstämmen (4, 5) eine Immunität zu entwickeln, wurden auch Immunisierungsmodi untersucht, bei denen Keime heterologer Spezies sowohl als Lebendimpfstoff als auch als nicht vermehrungsfähige Keimsuspensionen verwendet wurden. Letzteres wurde in zahlreichen Studien von RAETTIG untersucht. Orale Immunisierung geht nach RAETTIG (1979) einher mit einem Schutz auch vor der Infektion mit anderen als dem zur Immunisierung verwendeten Keim. So zeigte die orale Gabe hitzeinaktivierter *S. typhimurium*-Bakterien eine Schutzwirkung gegenüber der Infektion mit Columbia SK Virus (84). In Anlehnung an die 1970 von RAETTIG und MARQUARDSEN festgestellte Schutzwirkung von oralen Kombinationsimpfstoffen, denen spezifische Vakzinen nur geringfügig überlegen waren, verwendete RAETTIG (1979, 1981) polyvalente, orale Impfstoffe aus 12 respektive 16 verschiedenen Bakterienstämmen zum Teil unterschiedlicher Spezies. Im Mäuseschutz-

test wurde der auch auf andere Keimspezies übergreifende Schutz vor einer Belastungsinfektion nachgewiesen; ferner wurde die Wirkung des spezifischen Anteils durch die heterologen Anteile gesteigert, so daß der Kombinationsimpfstoff in einigen Fällen einer monovalenten, spezifischen Impfung überlegen war. Als Wirkungsmechanismen dieses paraspezifischen Schutzes wird von RAETTIG (1979) zum einen der Adjuvans-effekt der unspezifischen Antigene herangezogen, zum anderen könne durch ein vielen Enterobacteriaceen gemeinsames Antigen ein solcher Impfschutz vermittelt werden. So zeigten BARBER und EYLAN (1975, 1976) einen heterologen Impfschutz, den sie auf gemeinsame Protein-Antigendeterminanten der verwendeten Spezies zurückführten.

In eine ähnliche Richtung zielen auch die Untersuchungen von BLOCK et al. (1978), die einen Schutz gegen Infektion mit *S. typhimurium*- und *E. coli*-Keimen erzielten durch die Gabe von Ubiquinone 8 (Q8), einer aus der Wand gramnegativer Bakterien extrahierten Lipidfraktion. Diese Schutzwirkung führten BLOCK et al. (1978) auf die Stimulierung verschiedener Abwehrmechanismen zurück; so wiesen diese Autoren eine gesteigerte Phagozytoserate der Peritonealmakrophagen von Mäusen nach Gabe von Q8 nach.

Auch RAETTIG (1975) hält die gesteigerte Phagozytoseaktivität, induziert durch orale Immunisierung, für einen wesentlichen Faktor. Dahingehende Untersuchungen wurden von SCHULZE (1972, 1973) durchgeführt, in denen die Phagozytosekapazität von Mäuseperitonealmakrophagen sowohl nach spezifischer als auch nach unspezifischer Immunisierung untersucht wurde. Auch KIRCHNER (1982), der nach oraler Applikation eines K₈₈-tragenden *E. coli*-Stammes einen Schutz vor dem Haften einer Salmonellenbelastungsinfektion bei Mäusen fand, stellt die Steigerung der Mikro- und Makrophagenaktivität als Wirkungsmechanismus für diesen Schutz in den Vordergrund. Eine verstärkte Phagozytose fand schon 1894 PAWSLOWSKY als Ursache für die unspezifische Beeinflussung des Milzbrandes

durch Proteine; und 1902 entwickelte METSCHNIKOFF seine Phagozytose-theorie, die Kern seiner Vorstellungen über Immunität war.

Bei der Salmonellose steht die Phagozytose als Aktivität der Makrophagen im Vordergrund der gegen Salmonellen gerichteten Immunität. Dabei spielen diese Zellen sowohl im afferenten als auch im efferenten Glied des Immunsystems eine Rolle. So kommt es nach Wechselwirkung zwischen Antigenen und T-Lymphozyten zu einer Erhöhung der Anzahl von mononuklearen Phagozyten an der Eintrittsstelle der Bakterien, und die Makrophagen werden durch Lymphokine, die von den T-Lymphozyten sezerniert werden, aktiviert. Ein weiterer Mediator der zellulären Immunität stellt der migration inhibiting factor (MIF) dar. Die Bildung dieses Faktors ist antigenspezifisch und wirkt sich speziell auf die Ausdehnungs- und Adhärenzfähigkeit der Makrophagen aus, so daß sie in ihrer Beweglichkeit gehemmt sind.

Die Wechselwirkung Antigen mit T-Lymphozyten wirkt sich nicht nur auf die mononuklearen Phagozyten aus, sondern diese beeinflussen ihrerseits die Lymphozytenaktivität. Die Wechselwirkung von T-Lymphozyten und Makrophagen und die sich daraus bedingenden Regelkreise wurden 1982 von HAHN beschrieben. Der Einfluß der T-Lymphozyten kommt dabei bereits bei der Differenzierung der mononuklearen Zellen im Knochenmark zum Tragen. In diesem Regelkreis ist auch die Rolle der Makrophagen im afferenten Schenkel des immunologischen Geschehens enthalten, bei der die Makrophagen einen Vermittler bei der Erkennung von Antigenen durch T-Lymphozyten darstellen. WALDRON et al. (1973) diskutierten verschiedene Möglichkeiten dieser Vermittlung; zum einen direkte zytoplasmatische Verbindungen zwischen Lymphozyten und Makrophagen, zum anderen Stabilisierung der lymphozytären Antigenrezeptoren oder Aufarbeitung des Antigens durch die Makrophagen zu voller Antigenität. Obwohl die antigenaufbereitende Rolle von BECKER und RUDBACH (1979) bezweifelt wird, schreibt er den Makrophagen doch eine regulative Rolle bei

der Immunitätsentwicklung zu, indem sie durch selektives Freisetzen oder Abschirmen von Antigen für eine Stimulation sorgen, die längere Zeit anhält. BLANDEN et al. (1976) sind jedoch der Meinung, daß Antigene, die von Makrophagen aufgearbeitet wurden, T-Zellen besser aktivieren als freies Antigen.

Makrophagen nehmen auf die T-Lymphozytenaktivität nicht nur Einfluß durch Antigenpräsentation, sondern tragen zur Immunantwort durch die Sekretion des Lymphozyten-Aktivierungsfaktor (LAF) bei. Eine Reihe weiterer sekretorischer Produkte werden von Makrophagen bereitgestellt, von denen hier nur zwei am Rande erwähnt werden sollen: Durch die Sezernierung des Colonie Stimulating Factor (CSF) wird die Monozytopoese gefördert; andererseits kann PGE_2 von diesen Zellen freigesetzt werden, wodurch diese in der Lage sind, ihre eigene Anzahl zu regulieren.

Die Form der Immunität, in der Makrophagen eine zentrale Rolle spielen und die mehr auf zellulärer Basis arbeitet als auf der Bildung spezifischer Antikörper, wird als zellvermittelte, antibakterielle Immunität (CMI = cell mediated immunity) bezeichnet. Obwohl die zelluläre Immunität sicher nicht isoliert gesehen werden kann, kommt ihr jedoch bei fakultativ intrazellulär parasitierenden Keimen, wie den Salmonellen, eine besondere Bedeutung zu, zumal eine fehlende Schutzwirkung von Antiserum bei einer Salmonelleninfektion der Mäuse schon 1954 und 1956 von MUSCHEL und MUTO beziehungsweise MARCUS et al. beschrieben wurde. Die WHO (1972) postulierte, daß typisch und für den Krankheitsverlauf von entscheidender Bedeutung die Fähigkeit der Salmonellen sei, sich in Makrophagen aufzuhalten und zu vermehren. Serumantikörper spielen bei der Salmonellose also nur eine geringe Rolle - und nur im Frühstadium einer Infektion (36). Virulente Stämme siedeln nämlich rasch in die zum MPS gehörigen Organe ab, so daß dann nur eine zelluläre Aktivierung in der Lage ist, die Bakterien aus dem Gewebe zu entfernen.

Die Immunmechanismen, die bei Infektionen mit intrazellulären Parasiten, wie Salmonellen, operieren, sind ausgiebig studiert worden, und es herrscht die Auffassung, daß, während Antikörper nötig sind, die Phagozytose zu vermitteln, ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Erregerabwehr die Entwicklung einer zellulären Immunität ist, die die eindringende Bakterienpopulation nach der Phagozytose an einer Vermehrung im MPS hindert (23). Die zu diesem System (MPS) gehörigen Peritonealmakrophagen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, stellen eine heterogene Zellpopulation dar. Die einzelnen Subpopulationen sind mit verschiedenen Funktionen ausgestattet; so unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Bakterizidie, im Tragen von Ia-Molekülen und in ihrem Peroxidasemuster. Nach letzterem unterscheidet man Exsudat-Makrophagen, exsudat-residente und residente Makrophagen, wobei die residenten Makrophagen das Reifestadium darstellen, dem dieses Enzym fehlt. Peroxidase-negative Makrophagen zeigen dabei größere Bakterizidie als peroxidase-positive Zellen (8).

Die für eine effiziente Infektionsabwehr notwendige Aktivierung zeigt sich in bestimmten Merkmalen der Makrophagen, wie zum Beispiel: Rauhe Plasmamembran, Ausdehnungs- und Adhärenzfähigkeit, erhöhte Phagozytose, Vermehrung von Polysomen und Vesikeln und Sezernierung verschiedener neutraler Proteasen, wie zum Beispiel Plasminogenaktivator. Die Aktivierung wird in bestimmten Schritten vollzogen (21, 77).

Veränderungen in der Aktivität von Peritonealmakrophagen werden, wie oben ausgeführt, durch immunologische Vorgänge bewirkt, lassen sich aber auch durch verschiedene andere Stimuli erzielen, die eine zu untersuchende Makrophagenpopulation hinsichtlich ihrer Menge, Phagozytosekapazität und Bakterizidie beeinflussen. Solche intraperitoneal verabreichbaren Stimuli sind zum Beispiel Proteose-Pepton, Paraffin, Thioglycolat oder inaktiviertes *C. parvum*. Diese Stimulierung wirkt sich bei allen durch eine erhöhte Anzahl gewinnbarer Zellen

aus; jedoch sind die Makrophagenpopulationen in ihren speziellen Eigenschaften, speziell ihrer Phagozytosekapazität und Bakterizidie, unterschiedlich (37, 73). Während *C. parvum* ein direkter Makrophagenaktivator zu sein scheint, mit hoher bakterizider Aktivität gegen zum Beispiel Listerien, sind die Makrophagen von Thioglycolat-vorbehandelten Tieren größtenteils nicht ausgereift, setzen zwar Elastase und Plasminogenaktivator frei, zeigen aber eine sehr geringe Bakterizidie (73, 98).

Es bleibt noch die Frage der Erregerspezifität zu erörtern, der von aktivierten Makrophagen ausgehenden zellulären Immunität. 1963 definierten JENKIN und ROWLEY die zelluläre Immunität mit der Produktion neuer oder der Induktion bereits existierender Zellen, die sich durch die Fähigkeit auszeichnen, einen pathogenen Mikroorganismus, der sich vorher in den Zellen vermehren konnte, abzutöten. Diese Entwicklung wird durch eben diese Parasiten induziert; sie schlossen in ihre Definition die Erregerspezifität ein, da sie annahmen, daß die Bakterizidie von Makrophagen nur gegenüber dem induzierenden Pathogen gesteigert ist. Schon 1966 stellten COLLINS et al. fest, daß diese zellvermittelte Immunität nicht erregerspezifisch ist, sondern daß die Bakterizidie der Makrophagen vergrößert werden kann sowohl durch spezifische Mechanismen als auch durch unspezifische (38). Dieser Typ der Immunität ist unspezifisch in seiner Auswirkung, indem aktivierte Makrophagen ihre mikrobizide Aktivität auch gegen solche Bakterien richten, die nicht an der Immunisierung beteiligt waren (77). So entwickeln Makrophagen von Listerien-infizierten Tieren Bakterizidie nicht nur gegen das stimulierende Agens, sondern schützen auch gegen eine *S. typhimurium*-Infektion (18). Eine ähnliche unspezifische Makrophagenaktivierung gegenüber Salmonellen, induziert durch hitzeabgetötetes *C. parvum*, wurde von verschiedenen Autoren untersucht (18, 20). COLLINS und SCOTT (1974) verfolgten die Keimzahlreduzierung von *S. enteritidis* in Blut, Leber und

Milz bei Mäusen, die mit *C. parvum* i.v. vorbehandelt waren. Die gegenüber Kontrollmäusen schnellere Abnahme der Keimzahlen, besonders im Blut, führten sie auf das Vorhandensein von aktivierten Makrophagen zurück.

In einer vergleichenden Studie über die Beeinflussung der Bakterizidie von Peritonealmakrophagen gegenüber Salmonellen nach Behandlung von Mäusen mit TG (Thioglycolat) oder *C. parvum* wiesen BRILES et al. (1981) nach, daß TG-stimulierte Makrophagen zunächst eine geringe Bakterizidie gegenüber *S. typhimurium* aufwiesen; diese ließ sich jedoch durch nachträgliche Applikation von hitzeinaktiviertem *C. parvum* steigern. BRILES et al. (1981) kamen zu dem Schluß, daß ein durch *C. parvum* bedingter Infektionsschutz darauf beruhe, daß Zellen, die in vivo in der Lage seien zu phagozytieren, aber nicht abzutöten, und die Salmonellen vor bakteriziden Makrophagen schützten, durch die Aktivierung mit *C. parvum* in die Lage versetzt würden, die aufgenommenen Salmonellen auch abzutöten.

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, daß ein Schutz vor der Infektion mit *S. typhimurium* eine effektive Induktion der zellvermittelten Immunität erfordert.

Um die Wirkung einer Vorbehandlung auf das MPS (mononukleäres Phagozyten System) als Träger einer Resistenzbildung gegen Salmonellen zu untersuchen, gibt es verschiedene methodische Ansätze. Die Aktivität der zum MPS gehörigen Zellen läßt sich an Hand der Blutclearance eines i.v. applizierten Stoffes messen. Dabei wird die Phagozytosekapazität von Blutmonozyten entweder gegenüber Kohlepartikeln (14) oder gegenüber einem i.v. applizierten Mikroorganismus (70) ermittelt. Auf diese Weise untersuchten JÜRBECK et al. (1981) die Wirkung von synthetischen Salmonella-Vakzinen in Form von Protein-konjugaten auf diesen Parameter durch i.v. Applikation von *S. typhimurium* und wiesen eine erhöhte Clearance von *S. typhi-*

murium aus dem Blut vorbehandelter Tiere nach. Der Nachweis der Aktivität der Organmakrophagen in Milz und/oder Leber erfolgt durch Keimzahlbestimmung dieser Organe und Feststellung der Reduzierung der Keimzahlen in diesen Organen nach dem Setzen einer Infektion. Dieser in vivo Bakterizidietest ist eine gängige Methode, da - wie oben erwähnt - die Salmonellen schnell in diese Organe absiedeln. Sowohl spezifische Immunisierungsverfahren (36, 59) als auch die Auswirkung nichtspezifischer Immunisierung (70, 110) auf die Organmakrophagen werden auf diese Weise untersucht. So konnten MEDINA et al. (1975) durch Immunisierung mit bakteriellen RNA-Präparationen von *L. monocytogenes* und *S. typhimurium* die Bakterizidie der Organmakrophagen jeweils gegen den heterologen Belastungsorganismus steigern. ZINKERNAGEL (1976) wählte ebenfalls den in-vivo Bakterizidietest, um die Entwicklung einer zellvermittelten Immunantwort gegen *S. typhimurium* an Hand der nichtspezifisch gesteigerten bakteriziden Aktivität von Makrophagen gegen *L. monocytogenes* zu verfolgen. Die dritte probate Methode, die Aktivität des MPS zu ermitteln, ist die Durchführung eines in vitro Bakterizidietestes, bei dem freie Makrophagen in der Zellkultur untersucht werden (18, 41, 66). Dabei wird das zu phagozytierende Bakterium entweder in vivo, also in der Bauchhöhle durch i.p. Applikation (18) oder in der Lunge durch Aerosole, präsentiert (83) oder erst in der Makrophagenkultur - in vitro - hinzugefügt (18, 41). FURNESS (1958) zeigte nach in vitro Phagozytose von virulenten und avirulenten *S. typhimurium*-Stämmen, daß nach einer Initialphase der Bakterienabtötung durch die Makrophagen die überlebenden virulenten Salmonellen sich vermehrten. Ziel einer erfolgreichen Paramunisierung gegen *S. typhimurium* muß daher sein, die Bakterizidie von Makrophagen dahingehend zu beeinflussen, daß auch virulente Stämme abgetötet werden können.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Versuchsplan

Zur Untersuchung der Aktivität der Peritonealmakrophagen wurden die Mäuse in 6 Gruppen aufgeteilt. Eine der Gruppen wurde als Negativ-Kontrolle mitgeführt, die übrigen 5 Gruppen wurden einer Vorbehandlung unterzogen. Diese bestand in einer oralen Applikation von lebenden Keimen 5 verschiedener Bakterienspezies.

Diesem Vorgehen lagen die bereits erwähnten Untersuchungen von KIRCHNER (1981) zugrunde, der nach oraler Gabe von K₈₈-tragenden E. coli-Keimen eine Steigerung der Infektionsabwehr gegen *S. typhimurium* nachgewiesen hatte; es kam bei 15 % seiner so vorbehandelten Tiere zum Haften einer Belastungsinfektion, die 50 % der Kontrolltiere infizierte. Inwieweit dieser Schutz auf die Aktivierung des MPS zurückzuführen ist, und ob er im Zusammenhang mit dem Anheftungs-faktor K₈₈ steht, sollte durch das Verwenden eines K₈₈-tragenden und eines K₈₈-negativen E. coli-Stammes überprüft werden.

BLOCKSMA et al. (1981) studierten die Fähigkeit von Lactobacillus plantarum (L. pl.), eine nicht-spezifische Resistenz gegenüber *L. monocytogenes* zu erzeugen; dabei wurden sowohl lebende als auch hitzeinaktivierte Keime i.v. verabreicht. Es wurde durch diese Behandlung eine Stimulation des MPS nachgewiesen, die sich in einer Reduktion der Listerienzahlen in Milz und Leber, nach einer Belastungsinfektion mit diesem Keim, ausdrückte. Ferner konnte nach subkutaner Applikation der Lactobazillen in den Pfoten eine Lymphozytenproliferation in den abführenden Lymphknoten beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die *L. pl.*-Stämme als Immunmodulatoren dazu geeignet sein können, eine Steigerung der Infektionsresistenz herbeizuführen.

Inwieweit dies auch auf eine orale Applikation zutrifft und die Bakterizidie von Makrophagen gegen Salmonellen zu steigern vermag, sollte durch Aufnahme zweier L. pl.-Stämme in das Vorbehandlungsprogramm verfolgt werden.

Als vierter Keim wurde ein Yersinia enterocolitica- (Y. e.) Stamm verwendet, von dem bekannt war, daß er eine Aktivierung von Mäuseperitonealmakrophagen bewirkt (41). Für seine Verwendung sprach außerdem die Tatsache, daß es sich bei diesem Keim ebenfalls um ein fakultativ intrazelluläres Bakterium handelt.

In der fünften Gruppe wurde den Mäusen der gleiche Salmonella typhimurium- (S. tm.) Stamm gegeben, der später zur intra-peritonealen Applikation verwendet wurde. Mit dieser Gruppe sollte die Kinetik der Aktivität der Peritonealmakrophagen im Verlaufe einer S. tm.-Infektion verfolgt werden, das heißt hier konnte davon ausgegangen werden, daß sich bei diesen Tieren eine erregerspezifische Immunität entwickelt. In der Makrophagenaktivität dieser Gruppe manifestiert sich die Leistungsfähigkeit erregerspezifisch stimulierter Zellen.

Bei der Wahl, der für die Überprüfung der bakteriziden Wirkung der Peritonealmakrophagen geeigneten Tage, wurde verschiedenen in der Literatur beschriebenen Kriterien Rechnung getragen. 1969 beschrieben BLANDEN et al., daß 12 - 14 Tage nach Stimulierung des RES durch intravenöse Applikation von BCG-Keimen die größte Veränderung der freien Makrophagen hinsichtlich ihres Auftretens und ihrer funktionellen Aktivität zu beobachten sei. Dies galt ebenfalls für die Infektion mit L. monocytogenes (61). Ebenso fanden SCHULZE et al. (1973) bei ihren Untersuchungen über die Zeitkinetik der unspezifischen Phagozytoseaktivität nach Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen, daß die Phagozytoserate am 5. Tag beginnend langsam zu einem Plateau zwischen dem 11. und 16. Tag ansteigt, um danach zum 36. Tag hin auf den Normalwert abzufallen.

Anlehnend an diese Ergebnisse wurden die Tage der Untersuchung der Makrophagenaktivität mit 5., 13. und 20. Tag p.i. so gewählt, daß vor, während und nach einem eventuell zu erwartenden Aktivitätsmaximum untersucht wurde.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Vorversuche

In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten der Gewinnung und Kultivierung von Mäuseperitonealmakrophagen beschrieben (31, 92, 97). Dabei bestehen nicht so sehr Unterschiede in der Methode des Erntens der Zellen, sondern zunächst in der Wahl der Medien. Neben Medien wie CTCM (Complete Tissue Culture Medium) (18) und EAGLE-Basal-Medium (94) wird DULBECCO's MEM (Minimal Essential Medium) verwendet, das wegen seiner guten Pufferkapazität dem Medium 199 vorgezogen wird (31), und aus diesem Grund in den von mir durchgeführten Untersuchungen sowohl als Spül- als auch mit weiteren Zusätzen als Kulturmedium verwendet wurde. Die Art der Anlegung der Makrophagenkultur, sei es in Gewebekulturfläschchen (94) oder in kleinen Petrischalen (41), wird bestimmt durch die Fragestellung der jeweiligen Untersuchungen.

Bei der Ermittlung der Phagozytosekapazität oder Bakterizidie von Makrophagen gegenüber Keimen bestehen unterschiedliche Auffassungen bezüglich des Applikationsmodus der Keimsuspension. Während einige Autoren die Phagozytose der Keime *in vitro* ablaufen lassen (26, 34), halten BLANDEN et al. (1966) eine *in vivo* Phagozytose für günstiger, weil es zu einer schnelleren Aufnahme der Keime in der Bauchhöhle kommt; dieser Phagozytosemodus wurde ebenfalls von MAIER und OELS (1972) sowie ROWLEY et al. (1965) verwendet.

Die durch die Spülung der Bauchhöhle gewonnenen Makrophagen werden dann in den einzelnen Modellen auf verschiedene Weise zerstört, um die intrazelluläre Keimzahl zu ermitteln. Während FURNESS (1958) und MAIER und OELS (1972) die Zellen durch destilliertes Wasser zur Lysis bringen, verwenden HSU und MAYO (1973), MARECKI et al. (1975) und van FURTH et al. (1978) Ultraschall, um die intrazellulären Keime freizusetzen.

In längeren Vorversuchsreihen sind verschiedene Aspekte der angegebenen Arbeiten ausgetestet worden. Dabei wurden mehrere Parameter hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit und ihrer Reproduzierbarkeit überprüft:

1. Bezüglich der zu verabreichenden Salmonellendosis und ihrer Verweildauer im Peritonealraum wurden Versuche mit steigender Keimzahl pro ml jeweils mit und ohne Opsonisierung der Keime durchgeführt. Dabei wurde ein Phagozytoseindex von mindestens 3 Keimen pro Makrophage angestrebt, da eine kritische Schwelle aufgenommener Partikel überschritten sein muß, um das bakterizide Potential der Phagozyten sichtbar zu machen (6). BAUGHN und BONVENTRE (1975) zeigten dies an normalen Peritonealmakrophagen nach Phagozytose von *Staph. aureus*; bei einem Verhältnis von 18 Keimen pro 100 Makrophagen wurde die Keimzahl nur auf 12 pro 100 reduziert, während bei 1700 pro 100 Makrophagen phagozytierten Keimen diese auf 800 Keime pro 100 Makrophagen zurückgingen.

In den durchgeführten Vorversuchen wurden in steigender Keimkonzentration Salmonellensuspensionen zur Erzielung der angestrebten Quotienten von 3 Keimen pro Makrophage getestet. Die Phagozytoserate wurde hierfür durch kulturelle Bestimmung der intrazellulären *S. tm.*-Zahlen ermittelt. Im Bereich von 10^7 bis 5×10^8 erwies sich die Phagozytoserate mit weniger als 1 Keim pro Makrophage als ungenügend. Als geeignete Keimdosis ergab sich aus diesen Versuchen die Dosis von 10^9 Salmonellen pro Maus, wobei jeder Maus 0.1 ml einer Suspension der Keimdichte 10^{10} Salmonellen pro ml i.p. appliziert wurden.

In Anlehnung an die Ergebnisse von SCHROIT und GALLILIY (1977) wurde ein Phagozytoseintervall von 10 min gewählt. Nach BLANDEN et al. (1966) kann bei normalen Mäusen eine ausreichende Phagozytose opsonisierter Bakterien nur

beobachtet werden, wenn das Phagozytoseintervall größer als 5 min ist. Andererseits ist innerhalb dieser Zeitspanne keine Bakterienabtötung zu beobachten, so daß es möglich ist, einerseits genügend Zeit für die Phagozytose anzuberaumen, und andererseits trotzdem die gesamte Kurve der Bakterieninaktivierung zu erfassen (12).

Ferner erwies es sich für die Optimierung der Phagozytose als günstig, die Keime zur Opsonisierung mit 10 % fötalem Kälberserum für eine halbe Stunde bei 37° C zu inkubieren, wie es bei BRILES et al. (1981) und LEIJH und van FURTH (1982) beschrieben wurde.

Zur Orientierung über die Verteilung der phagozytierten Keime auf die einzelnen Makrophagen wurden von Proben der Zellsuspensionen nach der Phagozytose Objektträgerausstriche angefertigt, nach PAPPENHEIM gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, daß die einzelnen Makrophagen verschieden viele Salmonellen phagozytiert hatten; es gab Zellen die voll mit Salmonellen waren sowie eine größere Zahl Zellen, die bis zur Probenahme keinen Keim aufgenommen hatten.

2. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern, wurde eine konstante Zellzahl in der zur Überprüfung der gegen die phagozytierten Salmonellen gerichteten Bakterizidie hergestellten Zellsuspension eingestellt. Da gewonnene Exsudate von Einzelmäusen und selbst von gepoolten 5er Gruppen stark in ihrem Zellgehalt schwankten, wurden die Exsudate aller Tiere eines Versuchstages (10 Einzelmäuse) für die Zellgewinnung zusammengefaßt.
3. Die für die Abtötung extrazellulärer *S. typhimurium*-Keime im Kulturmedium zu verwendende Dosis Neomycin wurde ausgetestet. Es wurde die Wirkung von 7.5, 10, 15 und 20 µg pro ml getestet. Die Dosis von 20 µg pro ml erwies sich als konstant in ihrer bakteriziden Wirkung und zeigte auch nach

6 h Inkubation keine Resistenzbildung der Salmonellen (Streptomycin erwies sich als ungeeignet, da in allen 4 getesteten Dosierungen resistente Keime auftraten).

3.2.2. Material

3.2.2.1. Bakterienstämme

Zur Immunisierung der Mäuse wurden Keime folgender Spezies verwendet:

Spezies	Bezeichnung	Herkunft
Escherichia coli	0:138 K ₈₁ K ₈₈ positiv	(1)
	0:138 K ₈₁ K ₈₈ negativ	(1)
Yersinia enterocolitica	54/2B	(2)
Lactobacillus plantarum	Ib R7a S	(3)
	R43e (a)	
Salmonella typhimurium		(4)

Mit Ausnahme der Lactobacillus-Stämme wurden alle Stämme nach 24 h Bebrütung in 4 ml TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) mit 20 % Glycerin bei -20° C eingefroren. Die beiden Lactobacillus-Stämme wurden für die Dauer des Immunisierungsprogrammes (6 Tage) in MRS-Bouillon bei 4° C gelagert.

- (1) P.A.M. Guinée, Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven, Niederlande
- (2) Institutseigener Stamm (Stammvariante eines 1980 von JENTZEN und HELLMANN beschriebenen Stammes)
- (3) Institut für Fleischhygiene, FU Berlin
- (4) Dr. H. Dickel, Staatliches Veterinär-Untersuchungsamt, Oldenburg

3.2.2.2. Medien

3.2.2.2.1. Feste Nährmedien

Standard-I-Nähragar	(1)
Blutnähragar	- 5 ml Schüttelblut (vom Hammel) - 100 ml Standard-I-Nähragar
Sorbinsäureagar	(2)
TSYE-Agar (Trypticase Soy Yeast Extract)	(3)
Yersinia-Selektivagar nach Wauters	(1)

3.2.2.2.2. Flüssige Nährmedien

TSB-(Tryptic Soy Broth) Bouillon	(3)
MRS-Bouillon (Lactobacillus-Bouillon nach de MAN ROGOSA und SHARPE)	(2)

3.2.2.2.3. Zellmedien

DULBECCO's MEM (minimum essential medium), Kat. Nr. T 041-01	(4)
Hepes-Trockensubstanz	(5)
Albumin aus Rinderserum (lyophil. > 92 %)	(4)
Fötales Kälberserum, Kat.Nr. 0113, Chargen Nr. 109207	(4)
Liquemin Roche (Heparin 5 ml Ampullen à 25000 IU)	
Neomycin sulfuricum (Ph. Eur. II)	

(1) Merck, Darmstadt

(2) Institut für Fleischhygiene, FU Berlin

(3) Difco Laboratories, Detroit, USA

(4) Seromed, München

(5) Serva, Heidelberg

3.2.2.2.4. Lösungen

Bacto Pepton (1)

Pepton NaCl (physiologische Kochsalzlösung mit 1 %
Pepton)

Pepton-Leitungswasser (Leitungswasser mit 0,1 %
Pepton, autoklaviert)

Kristallviolett-Lösung 5.3 g Zitronensäure
0.25g Kristallviolett
in 250 ml Aqua bidest

Giemsas-Lösung (2)

May-Grünwald-Lösung (2)

3.2.2.3. Versuchstiere

Es wurden NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts aus institutseigener Zucht verwendet. Die Tiere wogen zu Beginn der Immunisierung 18 - 20 g. Die Tiere wurden in Gruppen zu jeweils 10 Tieren in MAKROLON^R-Käfigen der Größe 3, getrennt nach Geschlecht und Verwendungszweck, gehalten. Die Sägemehleinstreu wurde einmal pro Woche gewechselt. Die Tiere erhielten Pellets (ALTROMIN-Standard^R-Diät für Ratten und Mäuse) und Leitungswasser ad libitum.

3.2.3. Methoden

3.2.3.1. Herstellung der Keimsuspensionen

3.2.3.1.1. Optische Standardisierung

Für jeden verwendeten Stamm wurde zunächst die Keimzahl einer Suspension in Pepton-NaCl-Lösung bei der Extinktion 0.5 ($\pm$ 0.01)

(1) Difco Laboratories, Detroit, USA

(2) Merck, Darmstadt

bei 660 nm bestimmt (Spectrophotometer, Modell 24, Beckman)*:

E. coli K ₈₈ positiv/negativ	1.7/2.0 x 10 ⁸	Keime pro ml
Y. enterocolitica	1.5 x 10 ⁹	Keime pro ml
S. typhimurium	5.0 x 10 ⁸	Keime pro ml

Bei der Herstellung der erforderlichen Keimsuspensionen wurde dann zunächst eine Pepton-NaCl-Lösung mit der Extinktion 0.5 hergestellt und dann mittels Verdünnung oder Konzentrierung auf die gewünschte Keimdichte eingestellt.

3.2.3.1.2. Keimsuspensionen für die orale Vorbehandlung (Paramunisierung)

Die bei -20° C gelagerten Stammkonserven wurden in der Hand angetaut und die verflüssigte Keimsuspension wurde als Verdünnungsausstrich mit der Öse aufgetragen auf Nähragar (S. tm.), TSYE (Y. e.), Blutagarplatten (beide verwendeten E. coli) und bei 37° C, der Yersinia-Stamm bei 26° C, für 24 h bebrütet. Von den so beimpften Platten wurden circa 10 Kolonien auf 100 ml (50 ml bei dem Yersinia-Stamm) TSB-Bouillon in 300 ml Kolben mit Zellstopfen überimpft und auf einem Vielkolbenschüttler bei 37° C (100 doppelte Longitudinalbewegungen/min), der Yersinia-Stamm bei Zimmertemperatur (60 doppelte Longitudinalbewegungen/min), bebrütet. Die dichtbewachsenen Bouillons wurden jeweils in einem 100 ml Rundbodenzentrifugenglas in einer Heraeus-Minifuge 2 bei 5500 U (Umdrehungen) für 20 min sedimentiert. Die Pellets wurden in 1 ml Pepton-NaCl resuspendiert und mittels optischer Standardisierung wurde für jeden Immunisierungskeim (L. pl. siehe unten) eine Pepton-Leitungswasser-Suspension mit 1×10^7 Keimen pro ml hergestellt.

* Für die Herstellung von L. pl.-Suspensionen wurde gesondert verfahren, siehe 3.2.3.1.2.

Von den *Lactobacillus*-Stämmen wurden Verdünnungsausstriche auf Sorbinsäureagar angelegt und unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37° C für 48 h bebrütet. Von diesen Ausstrichen wurden circa 10 Kolonien auf je ein Reagenzglas mit 5 ml MRS-Bouillon überimpft und bei 37° C inkubiert. Nach 48 h Inkubationszeit enthielten diese Bouillons 1.1×10^9 Keime pro ml. Diese 10 ml *Lactobacillus*-Bouillon wurden zusammen mit Pepton-Leitungswasser auf 1×10^7 Keime verdünnt.

Von jeder der hergestellten Suspensionen wurde mittels eines Spiralplattengerätes (Spiralplater, Model B, Laméris) eine Keimzählung durchgeführt. Der *Yersinia*-Stamm wurde auf Wauters-Selektivagar, die Lactobazillen auf Sorbinsäureagar und die übrigen Keime auf Nähragar ausspiralisiert. Diese Platten wurden unter denselben Bedingungen wie die oben aufgeführten Verdünnungsausstriche bebrütet. Alle Keimzählungen erfolgten als Doppelbestimmungen.

Die Keimsuspensionen wurden für jeden Tag des Immunisierungsprogrammes frisch hergestellt.

3.2.3.1.3. Salmonellensuspensionen zur i.p. Applikation (i.p. Phagozytose)

Von der bei -20° C gelagerten Stammkonserve wurden 4 Nähragarplatten dicht mit der Öse beimpft und bei 37° C für 24 h bebrütet. Die Keime wurden am nächsten Tag mit 3 ml Pepton-NaCl pro Platte abgeschwemmt, durch einen sterilen Gaze-filter gegeben und für 20 min bei 6000 U pro min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit Pepton-NaCl resuspendiert und so eine Lösung mit der Extinktion 0.5 hergestellt. 48 ml dieser Suspension wurden zentrifugiert und das gewonnene Pellet mit 1.8 ml Pepton-NaCl aufgelöst. Nach dem Hinzufügen von 0.2 ml fötalem Kälberserum entsprach die Keimzahl circa 10^{10} Keimen pro ml.

3.2.3.2. Paramunisierungsmodus

Unter Verwendung der unter 3.2.2.1. aufgeführten Bakterienstämme wurden von den wie unter 3.2.3.1.2. hergestellten Pepton-Leitungswassersuspensionen 200 ml pro Tag in Tränkeflaschen den jeweiligen Mäusegruppen an 6 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Die Keimdichte der angebotenen Lösungen war auf 1×10^7 Keime pro ml für jeden Keim eingestellt. Die Tränkeflaschen wurden jeden Tag erneuert. Die Kontrollgruppen erhielten im selben Zeitraum Leitungswasser mit 0.1 % Pepton als Zusatz.

3.2.3.3. Makrophagenbakterizidietest

3.2.3.3.1. Medien

3.2.3.3.1.1. Spül- und Kulturmedium

Als Grundlage für Spül- und Kulturmedium diente DULBECCO's MEM (Minimal Essential Medium modifiziert nach DULBECCO), das nach Vorschrift mit HEPES-Spezialpuffer in Aqua bidest gelöst und mit 1N NaOH auf pH 7.0 eingestellt wurde. Nach Zugabe von 5 IU Heparin, bei Kulturmedium wurde ferner 20 µg pro ml Neomycinsulfat hinzugegeben, erfolgte die sofortige Sterilisierung von jeweils 100 ml mit einem Sartorius Sterilfilter durch 2 Zellulosenitrat-Filterscheiben (Porengröße: 0.2 und 0.1 µm) mit 1 at Stickstoffüberdruck. Das danach zugegebene fötale Kälberserum war zuvor bei 56° C für 30 min im Wasserbad inaktiviert worden (iFKS) (Spülmedium: 1 % iFKS; Kulturmedium: 10 % iFKS). Die Herstellung erfolgte in einer Sterilen Werkbank (Gelair, laminar air flow).

Alle fertigen Medien wurden in 100 ml-Schraubdeckelflaschen (Seromed) bei +4° C für höchstens eine Woche aufbewahrt.

3.2.3.3.1.2. Beschallmedium

Als Beschallmedium, in dem die Peritonealmakrophagen suspendiert wurden, diente Aqua bidest mit einem Zusatz von 50 µg pro ml Rinderalbumin. Das Beschallmedium wurde unter den gleichen Bedingungen wie die übrigen Medien steril filtriert und in 500 ml-Schraubdeckelflaschen (Seromed) bei +4° C aufbewahrt.

3.2.3.3.2. In vivo Phagozytose

Zur in vivo Phagozytose wurde eine Salmonellensuspension, wie unter 3.2.3.1.2. beschrieben, hergestellt. Vor der Verwendung wurde diese zur Opsonisierung mit 10 % FKS (Fötales Kälberserum) eine halbe Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

Jeder Maus wurden 0.1 ml mittels einer Tuberkulinspritze mit einer Einmalkanüle Nr. 12 intraperitoneal appliziert ($\approx 1 \times 10^9$ S. typhimurium pro Maus). Nach 10 min (=Phagozytoseintervall) wurden die Mäuse durch cervicale Dislokation getötet und ihre Bauchhöhle, wie unter 3.2.3.3.3. beschrieben, gespült.

Jede untersuchte Gruppe bestand aus 10 Mäusen.

3.2.3.3.3. In vitro Bakterizidietest

3.2.3.3.3.1. Zellgewinnung

Das bauchseitige Fell der getöteten Mäuse wurde mit 70 %igem Alkohol desinfiziert, und in der Medianen wurde ein maximal 0.5 cm langer horizontaler Hautschnitt durchgeführt. Dadurch konnte das Fell problemlos bis zum Hals und bis über die Oberschenkel entfernt werden, so daß eine große Fläche des Peritoneums frei lag. Mit einer Einmalspritze und Einmalkanüle Nr. 1 wurden 3 ml Spülmedium in der Linea alba circa

0.3 cm caudal des Nabels in die Bauchhöhle injiziert. Mit einer sterilen Kanülentülle wurde das Abdomen massiert. Durch vorsichtiges Punktieren mit einer Einmalkanüle Nr. 1 lateral im rechten und linken Mesogastrium wurde die Peritonealflüssigkeit unter Vermeidung der Aspiration von Darmteilen oder Teilen des Mesenteriums abgezogen.

Die so gewonnenen Spülflüssigkeiten wurden in einem 45 ml-Einmalzentrifugenbecher mit Schraubdeckel (Conical tubes, Falcon 2075F) gesammelt; dieser wurde während der Präparation auf Eis gelagert, bis alle Proben genommen waren. Die gepoolten Proben von 10 Mäusen wurden sofort bei 4° C zentrifugiert (200 g für 10 min) (Heraeus Minifuge 2). Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden 1:10 mit Kristallviolettlösung verdünnt; hiermit wurde in einer FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer bei 160-facher Vergrößerung die Zellzahl ermittelt. In insgesamt 4 Zählquadraten wurden nur Zellen erfaßt, die das typische Aussehen von Monozyten zeigten; Lymphozyten und Granulozyten, deren Anteil stets kleiner als 10 % war, wurden nicht erfaßt.

Um die Zellsuspension auf 1×10^6 Makrophagen pro ml einzustellen, wurde die benötigte Ergänzungsmenge Kulturmedium nach folgender Formel errechnet:

$$E = 10 \times \frac{N \times 5 \times 10^4}{1 \times 10^6} - 5 \text{ ml}$$

E = Ergänzungsmenge Kulturmedium

N = Zellzahlmittelwert aus 4 Quadraten

Eine Überprüfung der Zellzahl durch Probenahme aus den Röhrchen und Zählung in der FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer erfolgte nach der Portionierung der Suspension und nach 120 min Inkubationszeit; die ermittelten Werte lagen sowohl für 0 min als auch für 120 min bei $1 \times 10^6 \pm 0.26$.

3.2.3.3.3.2. Untersuchung der bakteriziden Wirkung der Peritonealmakrophagen

Entsprechend den zu untersuchenden Zeitintervallen (0, 30, 60, 90, 120 min) wurde in 5 sterile Spitzröhrchen jeweils 1 ml der auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellten Zellsuspension gegeben. Zur Bestimmung des 0 min-Wertes wurde das entsprechende Röhrchen sofort bei 4° C zentrifugiert (200 g für 5 min). Der Zentrifugationsüberstand wurde abpipettiert und die Keimzahl bestimmt. Das Zellpellet wurde mit 5 ml Beschallmedium resuspendiert und zur Freisetzung der intrazellulären Salmonellen 20 sec mit einer Mikrospitze (B30) (Eintauchtiefe 1 - 1.5 cm) beschallt (Sonifier Cell Disruptor, Stufe 3, 50 % Arbeitstakt) (entspricht einer effektiven Beschalldauer von 10 sec). Danach wurde die auf diese Weise freigesetzte Zahl von lebenden Salmonellen durch Keimzählung bestimmt.

Die übrigen 4 Röhrchen wurden sofort nach der Portionierung bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Um eine starke Sedimentation der Zellen zu verhindern, wurden sie im Wasserbad in einer 40°-Position bei Stufe 3 geschüttelt. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde mit diesen Röhrchen auf die gleiche Weise verfahren wie für den 0 min-Wert beschrieben.

3.2.3.3.4. Neomycinabsterbekurve (Absterbekurve der Salmonellen im zellfreien Kulturmedium)

Zur Beurteilung des Schicksals der extrazellulären Salmonellen unter der Wirkung des Chemotherapeutikum-Zusatzes wurde eine Salmonellensuspension in dem neomycinhaltigen Kulturmedium parallel zum Bakterizidietest bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Die Ausgangskeimdichte lag dabei im Bereich der Keimdichte des Zentrifugationsüberstandes des 0 min-Wertes des Bakterizidietests. Die Keimzahlen wurden ebenfalls für 0, 30, 60, 90, 120 min ermittelt.

3.2.3.3.5. Keimzählung

Zur Bestimmung der Keimzahlen der jeweiligen Suspensionen wurden diese mit einem Spiralgerät (Spiralplater, Model B, Laméris) auf Standard-I-Nähragar ausspiralisiert und nach 24 h Bebrütung bei 37° C ausgezählt.

3.2.3.3.6. Objektträgerausstrich

Es wurden Proben des 0 min- und des 120 min-Wertes zur Anfertigung eines Objektträgerausstriches des jeweiligen Zellpellets nach der Zentrifugation entnommen. Die luftgetrockneten Objektträgerausstriche wurden nach PAPPENHEIM angefärbt und mit Ölimmersion unter dem Mikroskop betrachtet.

3.2.3.4. Statistische Methoden

Durch das Paramunisierungsprogramm ergaben sich 6 unterschiedliche Gruppen. Mit jeder Gruppe wurden im Wiederholungsansatz 4 Versuchsdurchläufe durchgeführt.

Für die Auswertung faktorieller Versuchspläne, wie dem vorliegenden, empfiehlt sich die Varianzanalyse (108). Im vorliegenden Fall sind

- die Behandlungen $B_1, \dots, B_6$
- die Untersuchungstage 5., 13. und 20. Tag
- Minuten nach Inkubierungsstart 0, 30, 60, 90 und 120

die Einflußfaktoren, die analysiert werden sollten. Wir wählten ein dreifaktorielles Varianzanalysenmodell, wobei sämtliche Wechselwirkungen zwischen den Faktoren mit berücksichtigt wurden. Um die Interpretation des zeitlichen Verlaufs des Versuchsgeschehens nach Start der Inkubierung der Zellsuspensionen zu erleichtern, beschränken wir uns bei der Analyse auf den linearen und den quadratischen Trend. Daraus erklärt sich, daß die im Modell ge-

geschätzten Mittelwerte (estimated means) geringfügig von den arithmetischen Mitteln der Einzelwerte abweichen können. Die abhängigen Variablen waren die intra- und extra-zelluläre Salmonellenzahl (logarithmisch transformiert).

Für die Phagozytoserate wurde ein zweifaktorielles Varianzanalysenmodell verwendet. Der Faktor "Minuten nach Inkubierungsstart" entfällt in diesem Fall.

Zusätzlich wurde in einer Covarianzanalyse geprüft, ob die i.p. verabfolgte Salmonellendosis die Phagozytoserate beeinflusst.

Um eine Aussage über die Genauigkeit der ermittelten Einzelergebnisse zu erhalten, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die i.p. Dosis, die Einstellung der Makrophagenzahl und die intra- und extra-zelluläre Salmonellenzahl in einem zehnfachen Ansatz bestimmt wurde. Mit den Logarithmen dieser Wiederholungswerte wurden der Variationskoeffizient und der einfache Streubereich bestimmt.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. I.p. Dosis

Die intraperitoneal applizierten Salmonellensuspensionen hatten eine Konzentration von 8.9×10^8 bis 1×10^9 S. tm. pro Maus. Die Auswertung ergab keinen signifikanten Einfluß der Schwankung innerhalb dieses Bereiches auf die unter 3.3.2. aufgeführten Phagozytoseraten der 6 untersuchten Gruppen.

3.3.2. Phagozytoseraten

Die Ergebnisse der Mittelwertsbestimmungen der durchschnittlich phagozytierten S. tm. sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt.

Die in Tabelle 1 aufgeführten, über den gesamten Untersuchungszeitraum gemittelten Phagozytoseraten weisen für die mit Y. e. vorbehandelten Tiere eine deutlich höhere Anzahl phagozytierter Keime auf als die übrigen Gruppen, deren Werte nicht wesentlich differieren.

Tab. 1: Phagozytoseraten gemittelt aus den
Tagen 5, 13 und 20 (S. tm./Makrophage)

Gruppe	N	K-	K+	Y.e.	L.pl.	S.tm.
	15	17	16	25	16	14

Tab. 2: Mittelwerte der Phagozytoseraten an den Tagen 5, 13 und 20 (S. tm./Makrophage)

Gruppe	N	K-	K+	Y.e.	L.pl.	S.tm.
5.Tag	20.4	16.9	19.0	41.6	14.4	12.5
13.Tag	16.5	17.7	19.0	18.1	17.3	21.3
20.Tag	12.3	19.0	13.4	22.9	18.1	12.5

Wie aus Tabelle 2 und Abbildung 1 hervorgeht, ist die Phagozytosekapazität der Y. e.-Gruppe am 5. Tag um mehr als das doppelte größer als die der Kontrollgruppe, und auch am 20. Tag liegt der Mittelwert höher als in allen anderen Gruppen. Dagegen ist die Phagozytoserate der so vorbehandelten Mäuse am 13. Tag nicht auffällig.

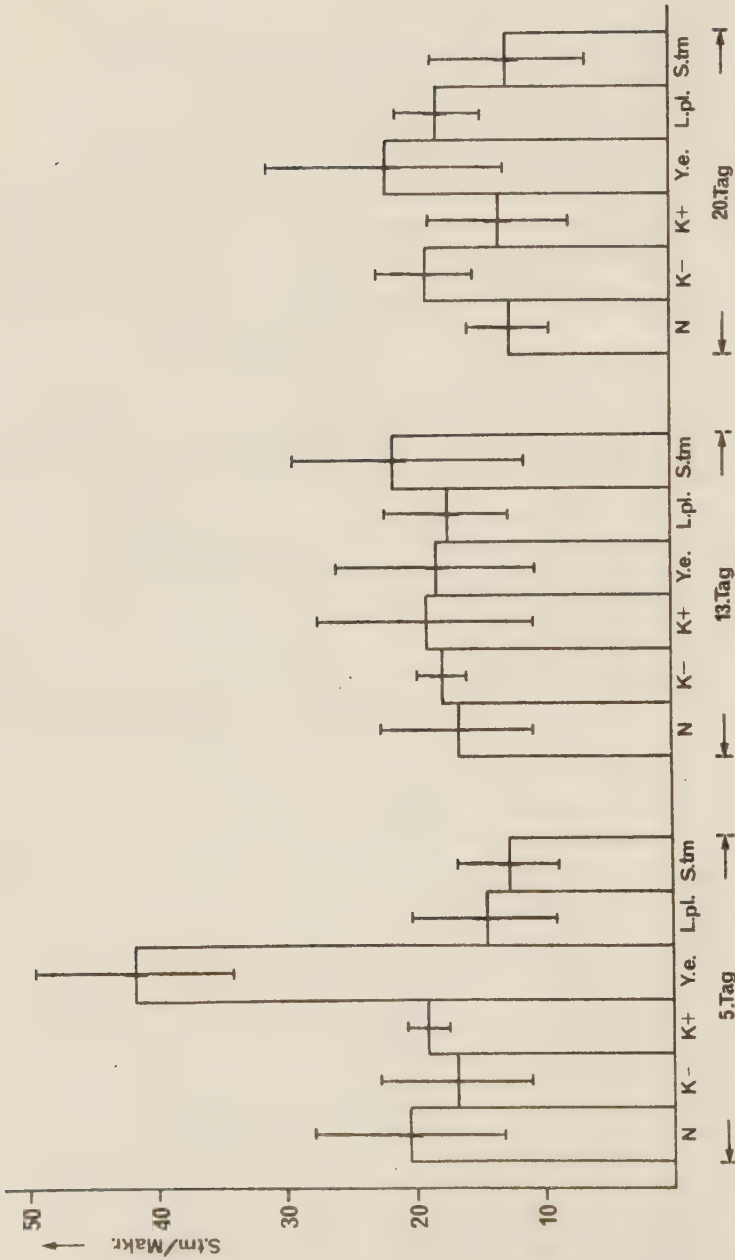


Abb. 1: Darstellung der Mittelwerte der Phagozytoseraten (S. tm. Keime/Makrophage) der Tage 5, 13 und 20 p.i. mit Standardabweichung

3.3.3. Ergebnisse des Bakterizidietestes

Die Einzelergebnisse der Keimzahlbestimmungen der beschallten Makrophagensuspensionen sowie der Zentrifugationsüberstände sind in den Tabellen 7 bis 12 des Anhangs enthalten.

Die Grundlage der folgenden Darstellungen der bakteriziden Wirkung der Makrophagen bildet die Untersuchung der prozentualen Werte der intrazellulären Salmonellenzahl bezogen auf den Zeitpunkt 0 min als 100 %, wie sie in der Tabelle 3 und der Tabelle 4, Seite 53, wiedergegeben sind. Diese Zahlen basieren auf den in der Varianzanalyse erstellten Mittelwerten, die in Tabelle 16 des Anhangs aufgeführt sind.

Tab. 3: Mittelwerte der intrazellulären S. tm.-Konzentration der Tage 5, 13 und 20

Minuten	0	30	60	90	120
N	100	63	52	52	63
K-	100	65	50	47	50
K+	100	61	51	43	41
Y. e.	100	57	42	35	42
L. pl.	100	78	63	52	51
S. tm.	100	77	61	55	52

Aus Tabelle 3 wird deutlich, daß die bakterizide Aktivität gegenüber S. tm. bei der Y. e.-Gruppe am größten ist. Im Mittel werden bis zu 65 % der phagozytierten Keime abgetötet. Es folgen die K+ und die K- Gruppe mit einer mittleren maximalen Abtötungsquote von 59 respektive 53 %. Die maximale Aktivität der S. tm.- und L.pl.-Gruppe entspricht mit 48 respektive 49 % der der Kontrollen.

3.3.3.1. Darstellung des Verlaufs der Makrophagenaktivität

Im folgenden soll auf die Kinetik der Makrophagenaktivität eingegangen werden. Die Kurven der Abbildungen 2, 3 und 4 sind graphische Darstellungen der in Tabelle 4 (Seite 53) angegebenen prozentualen Werte der intrazellulären Salmo-nellenkonzentrationen.

3.3.3.1.1. Darstellung der Kurvenverläufe des 5. Tages p.i.

Allen Gruppen gemeinsam ist die Reduzierung der intrazellulären Keimzahl während der ersten 60 min. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, ergeben sich deutliche Unterschiede im Ausmaß dieser Reduzierung.

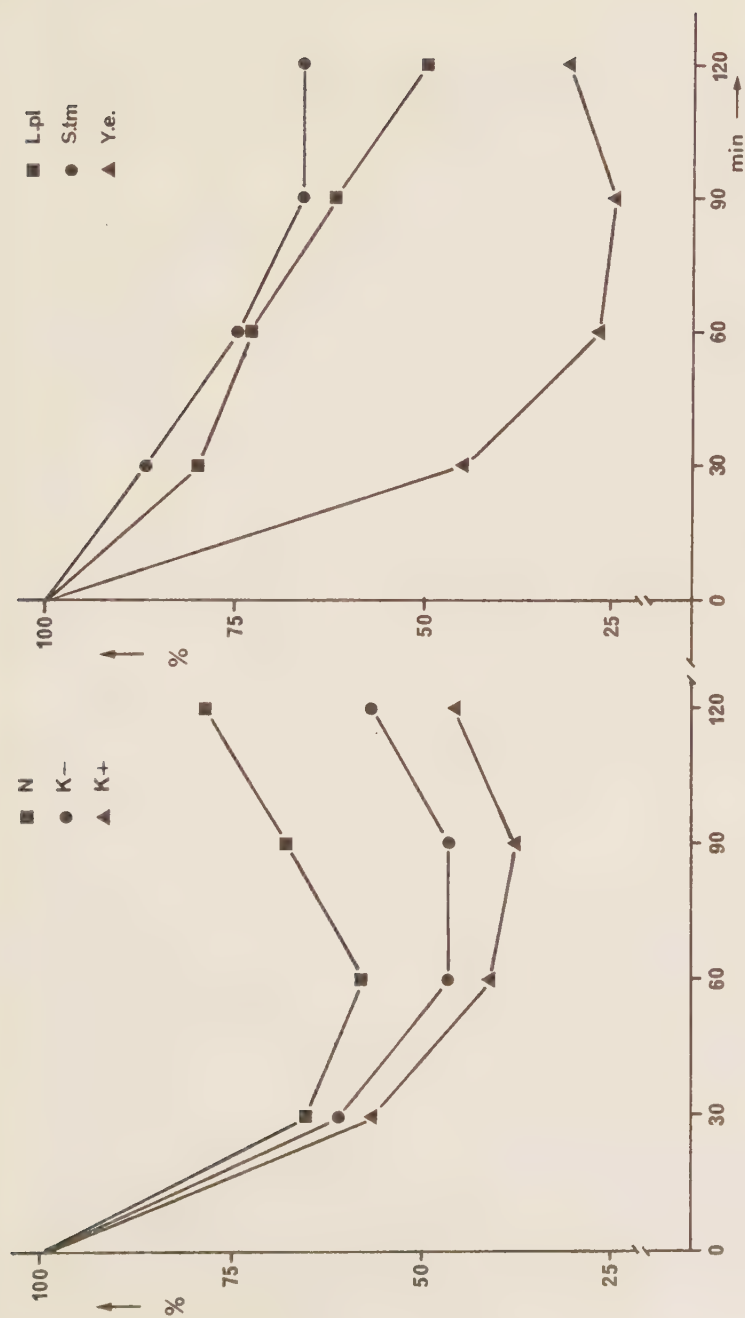


Abb. 2: Kinetik der intrazellulären Salmonellenkonzentration am 5. Tag p.i.
Angaben in % bezogen auf den 0 min Wert als 100 %.

Der zeitliche Verlauf der Makrophagenaktivität der Kontrollgruppe fällt dadurch auf, daß hier die intrazelluläre Keimvermehrung bereits nach 60 min einsetzt und von 58 % (60 min) auf 79 % (120 min) der Ausgangskeimdichte ansteigt.

Am auffälligsten ist die Stärke der Bakterizidie der Makrophagen der Y. e.-Gruppe. Hier kommt es bereits nach 30 min zu einer Reduzierung der phagozytierten Keime um 55 %, die sich zum 60 min-Wert hin fortsetzt, so daß nach 1 h nur noch 27 % der aufgenommenen Keime vorhanden sind. Nach 90 min beginnen sich die verbliebenen 25 % der Keime zu vermehren (um 6 %).

Die beiden E. coli-Gruppen haben zwar annähernd die gleiche Ausgangskeimdichte (siehe Tabelle 13, Seite 92) und erreichen nach 60 min eine Keimreduzierung um mehr als 50 %, jedoch ist die Bakterizidie der K+ Gruppe stärker (6 %) und hält auch nach 60 min noch an, während die Keimreduzierung in der K-Gruppe zum Stillstand kommt. Ebenso wie in der Yersinia-Gruppe steigen die intrazellulären Keimzahlen auch bei den E. coli-Gruppen wieder an (K+ um 9 %, K- um 10 %).

Die beiden übrigen Gruppen weichen von den bisher beschriebenen Verläufen ab:

Die Salmonellengruppe erzielt den geringsten Erfolg in der Abtötung der phagozytierten Keime. Nach 90 min sind erst 34 % der intrazellulären Keime abgetötet, während zum Beispiel bei der Kontrollgruppe bereits nach 60 min 42 % abgetötet sind. Allerdings steigt die Keimzahl bei der Salmonella-Gruppe nach 90 min nicht an, sondern es kommt zur Stase.

Die L. pl.-Gruppe, die annähernd die gleiche Anzahl phagozytierter Keime aufweist wie die S. tm.-Gruppe (siehe Tabelle 13 Seite 92), hebt sich von den übrigen Gruppen dadurch ab, daß hier eine kontinuierliche, wenn auch langsam einsetzende bakterizide Aktivität der Makrophagen vorliegt. Diese Keim-

reduzierung hält auch nach 90 min noch an, so daß zu diesem Zeitpunkt allein bei dieser Gruppe eine weitere Reduzierung über 90 min hinaus erfolgt.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß die Aktivität der Makrophagen der Y. e.- und der L. pl.-Gruppe am 5. Tag am effektivsten ist: Während die Y. e.-Makrophagen deutlich die größere Bakterizidie besitzen (Keimreduzierung um 75 %), hält allein bei der L.pl.-Gruppe die Keimreduzierung über den gesamten untersuchten Zeitraum an.

3.3.3.1.2. Darstellung der Kurvenverläufe am 13. Tag p.i.

Zunächst fällt auf, daß die in Abbildung 3 gezeigten Kurvenverläufe sich im Vergleich zum 5. Tag angenähert haben, das heißt die Makrophagenaktivitäten weisen nicht so große Schwankungen zwischen den einzelnen Gruppen auf.

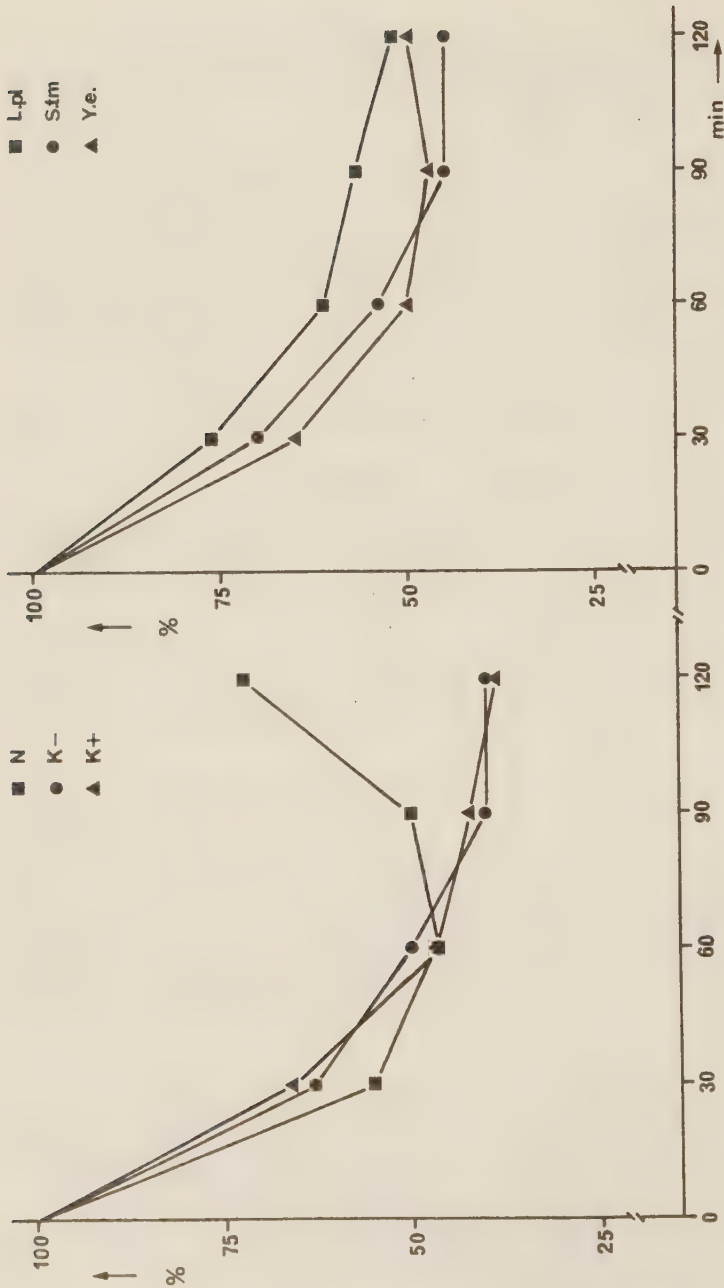


Abb. 3: Kinetik der intrazellulären Salmonellenkonzentration am 13. Tag p.i.
Angaben in % bezogen auf den 0 min Wert als 100 %.

Die Kinetik der Keimzahlreduzierung in den Makrophagen gleicht bei der Kontrollgruppe den am 5. Tag ermittelten Ergebnissen insofern, als bereits nach 60 min ein Wiederanstieg der zu diesem Zeitpunkt auf 47 % des Ausgangswertes reduzierten Salmonellenzahlen zu beobachten ist. Eine derartige Entwicklung ist bei keiner der vorbehandelten Gruppen festzustellen. Die Keimzahlreduzierung setzt sich bei diesen Gruppen bis zu 90 min oder auch bis 120 min fort. In diesem Bereich der Kurvenverläufe ist für 3 der 5 vorbehandelten Gruppen (K-, K+, Y.e.) der auffallendste Unterschied gegenüber dem 5. Tag festzustellen. Während dort bei diesen 3 Gruppen ein mehr oder weniger deutlicher Anstieg der Salmonellen zwischen 90 und 120 min eintritt, findet diese Entwicklung am 13. Tag nicht statt; Keimzahlanstiege bleiben, sofern sie überhaupt eintreten (Y. e.), gering.

Wie bereits am 5. Tag - dort jedoch als Gegensatz zu den übrigen Gruppen deutlicher - erfolgt die Salmonellenreduzierung in den Makrophagen der mit S. tm. und L. pl. vorbehandelten Mäusen zögernder als in allen anderen Gruppen einschließlich der Kontrollen. Erst nach 90 oder 120 min stellt sich hier ein den anderen Gruppen entsprechendes Reduzierungsergebnis ein.

Im Vergleich zum 5. Tag zeigen die beiden E. coli-Gruppen eine stärkere Bakterizidie als die übrigen Gruppen. Die Y. e.-Gruppe hat die starke mikrobizide Aktivität ihrer Makrophagen verloren und sich den anderen Gruppen angeglichen. Demgegenüber steht die Salmonellengruppe, die im Vergleich zum 5. Tag eine Steigerung der Bakterizidie der Makrophagen zeigt.

3.3.3.1.3. Darstellung der Kurvenverläufe am 20. Tag p.i.

Die in Abbildung 4 aufgetragenen Aktivitätskurven zeigen einen übereinstimmenden Verlauf, so daß zwischen den 6 Gruppen nur geringe Unterschiede festzustellen sind.

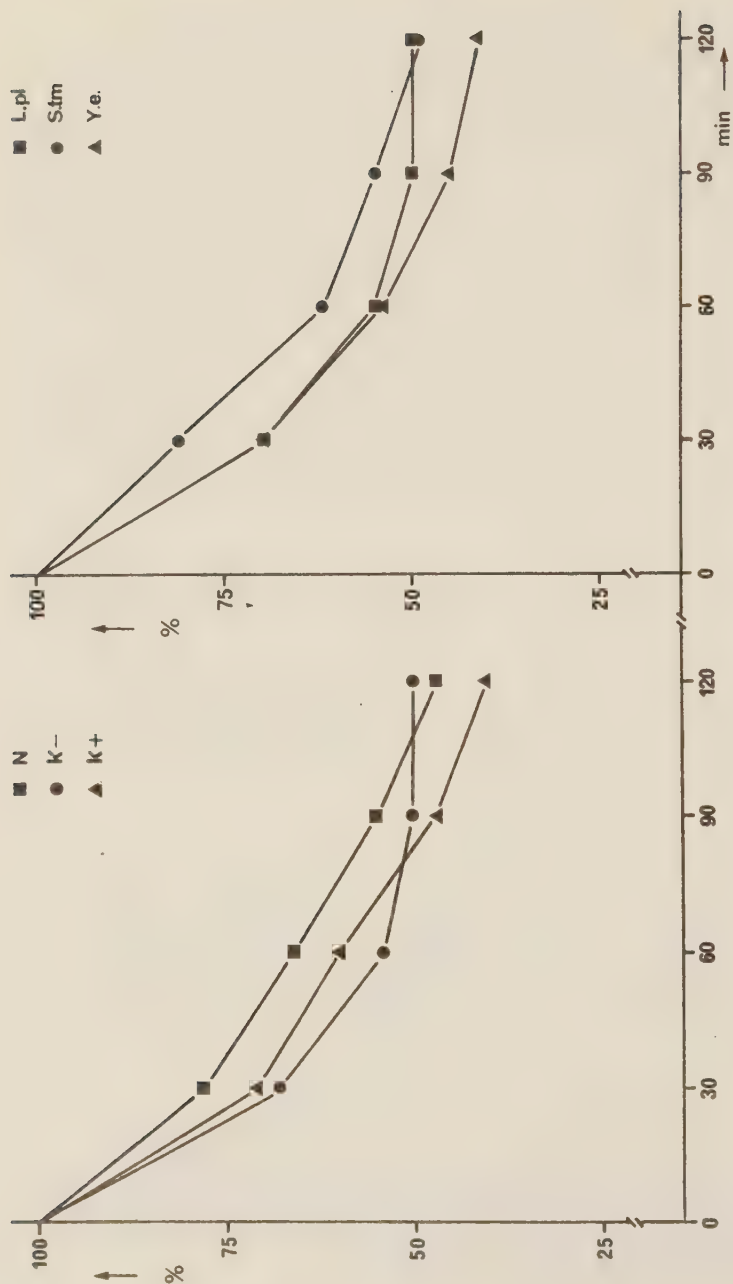


Abb. 4: Kinetik der intrazellulären Salmonellenkonzentration am 20. Tag p.i.
Angaben in % bezogen auf den 0 min Wert als 100 %.

Die Keimreduzierung liegt bei allen Gruppen zwischen 50 und 60 %, und es erfolgt kein Anstieg der intrazellulären Salmonellenkonzentration; vielmehr werden die Salmonellen im Verlauf der gesamten Beobachtungszeit reduziert oder ihre Zahl bleibt zwischen 60 und 120 min konstant. Dies soll besonders in Bezug auf die Kontrollgruppe hervorgehoben werden, bei der am 5. und am 13. Tag nach 60 min ein Wiederansteigen der Keimzahl eintrat. Es ergeben sich - die Kontrollgruppe ausgenommen - keine wesentlichen Unterschiede in dem Keimzahlreduzierungsvermögen der Makrophagen gegenüber dem 13. Tag. Wiederum ist die Reduzierung der Salmonellen in den Makrophagen der mit diesem Keim vorbehandelten Mäusen im Vergleich zu den mit anderen Keimen vorbehandelten Tieren anfangs verzögert.

Aus dem bisher Gesagten lassen sich folgende Tendenzen hinsichtlich der Aktivitätskinetik der Makrophagen ablesen:

- die Punkte der niedrigsten intrazellulären Keimzahl (=Zeitpunkt der maximalen Keimreduzierung) verschieben sich über den untersuchten Zeitraum zum 120 min-Wert; während
 - am 5. Tag der Tiefstpunkt 2 mal bei 30 min (K-, N)
3 mal bei 60 min (K+, Y.e., S.tm.)
1 mal bei 120 min (L.pl.),
 - am 13. Tag 1 mal bei 30 min (N)
3 mal bei 60 min (K-, Y.e., S.tm.)
2 mal bei 120 min (K+, L.pl.)
- liegt, wird dieser Wert
 - am 20. Tag 2 mal bei 60 min (K-, L.pl.)
4 mal bei 120 min erreicht.
- mit der Verschiebung der Bakterizidiemaxima geht ein Angleichen an die Makrophagenaktivität der verschiedenen Gruppen einher; dies beruht einerseits darauf, daß die bakterizide Wirkung der Makrophagen der Kontrollgruppe am 13. und 20. Tag größer ist als am 5. Tag; während am 5. Tag 4 Gruppen eine stärkere Keimreduzierung erreichen und

am 13. Tag 3 Gruppen, erzielen am 20. Tag nur noch 2 Gruppen eine niedrigere intrazelluläre Keimzahl als die Kontrollgruppen. Zum anderen drückt sich das Angleichen im Geringerwerden der Unterschiede an den einzelnen Zeitpunkten aus: Am 5. Tag maximal 48 % und am 20. Tag maximal 13 % Differenz.

- eine Erhöhung der Bakterizidiemaxima ist mit der Verschiebung auf den letzten Untersuchungszeitpunkt (120 min) nicht verbunden. Im Mittel betragen die Minimalwerte der überlebenden Keimanteile 47 % (5. Tag), 45 % (13. Tag) und 46 % (20. Tag).
- die Gruppen, bei denen am 5. Tag die intrazelluläre Keimzahl nach anfänglicher Reduktion wieder zunahm, zeigen am 13. Tag nur noch geringe Zunahme der Salmonellen (K+, Y.e.) oder Stase (K-), so daß die stärkste Keimreduzierung, wie zuvor erwähnt, auf den 120 min-Wert fällt.

3.3.3.2. Zusammenfassende Darstellung der bisher erwähnten Ergebnisse

Zieht man - die Phagozytoserate

- die maximal erzielte intrazelluläre Keimreduzierung

- das Ausmaß der intrazellulären Keimvermehrung

als Kriterien zur Beurteilung der Makrophagenaktivität heran, so lassen sich folgende Feststellungen treffen:

Die Vorbehandlung mit Y. e. führt als einzige zu einer Phagozytosesteigerung, die allerdings nur am 5. Tag zu beobachten ist. Hier ist jedoch die Phagozytoserate im Mittel doppelt so hoch wie die aller anderen Gruppen.

Hinsichtlich der Bakterizidie ist die deutlichste Aktivität bei der K+ und der Y. e.-Gruppe zu verzeichnen, die ebenfalls am ausgeprägtesten am 5. Tag ist. Beide Gruppen liegen an diesem Tag in ihrem Keimreduzierungsmaximum weit unterhalb des Wertes der Kontrollgruppe und ebenfalls unter denen der

anderen vorbehandelten Gruppen. Dabei schneidet die Y. e.-Gruppe am 5. Tag sowohl in der Keimreduzierung und Anfangsbakterizidie (0 bis 60 min), als auch hinsichtlich der Unterdrückung der Keimzunahme nach 90 min besser ab als die K+ Gruppe. Die Steigerung der bakteriziden Wirkung der Makrophagen durch die Vorbehandlung mit Y. e. und K+ manifestiert sich nur am 5. Tag deutlich mit entsprechend großen Differenzen zu der Aktivität der Kontrollgruppe; die Zahl der überlebenden Salmonellen differiert zu diesem Zeitpunkt um 33 % (Y. e.) und 20 % (K+). Diese Aktivitätsmaxima liegen dann bei 60 oder 90 min, und es folgt immer ein Wiederanstieg der Keimzahlen. Am 13. Tag stellt sich das Verhältnis der beiden Gruppen etwas anders dar. An diesem Tag weist die K+ Gruppe sowohl eine stärkere Abnahme der Salmonellen als auch eine fehlende Wiederrücknahme der intrazellulären Keimzahl auf. Beide Gruppen verhalten sich am 20. Tag annähernd gleich, schneiden aber bezüglich der maximalen Keimreduzierung wiederum von allen Gruppen am besten ab.

Somit ist die Gruppe, die mit Y. e. vorbehandelt wurde, am 5. Tag die Gruppe mit der größten Phagozytoserate und mit der größten Bakterizidie respektive die Gruppe, deren Makrophagen die größte Aktivitätssteigerung gegenüber der Kontrollgruppe erfahren hat. Gegenüber der Kontrollgruppe hat auch die K+ Gruppe eine deutliche Aktivitätssteigerung erfahren, wenn diese auch etwas geringer ausfällt als die der Y. e.-Gruppe.

Bei den übrigen Gruppen zeigt sich ein Einfluß der Vorbehandlung auf die Fähigkeit zur Keimreduzierung nicht so deutlich; jedoch sind im Vergleich zur Kontrollgruppe die Keimzahlen im Reduzierungsmaximum bei der K- Gruppe am 5. und 13. Tag niedriger und auch die Keimvermehrung bleibt geringer (5. Tag beziehungsweise fehlt (13. Tag)). Die Differenz überlebender Salmonellen im Aktivitätsmaximum (11 %), fällt gegenüber der Kontrollgruppe allerdings weniger deutlich aus als bei mit Y. e. oder K+ vorbehandelten Tieren.

Bei der L. pl.-Gruppe fällt die Steigerung der bakteriziden Wirkung der Makrophagen, wenn man von einer solchen sprechen kann, gering aus. Lediglich am 5. Tag ist eine geringe negative Differenz zu den Kontrollen mit 8 % weniger überlebenden Salmonellen vorhanden, der positive Differenzen von 5 % (13. Tag) und 3 % (20. Tag) gegenüberstehen. Die Makrophagen von mit L. pl. vorbehandelten Mäusen zeichnen sich aber dadurch aus, daß an keinem der Untersuchungstage ein Wiederanstieg der intrazellulären Salmonellenzahl auftritt. Diese Beobachtung trifft namentlich für den 5. Tag zu, an dem in keiner der übrigen Gruppen die Makrophagen in der Lage sind, die intrazelluläre Keimvermehrung zu unterdrücken.

Die Auswirkung der Vorbehandlung mit S. tm. stellt sich wie folgt dar: Während alle vorbehandelten Gruppen am 5. Tag im Maximum eine größere Keimreduzierung erreichen als die Kontrollen, tritt eine Steigerung der Bakterizidie innerhalb der S. tm.-Gruppe erst am 13. Tag in Erscheinung. Am 5. Tag fällt die Keimreduzierung schwächer aus als in den anderen Gruppen; allerdings kommt es nicht zu einem Wiederansteigen der Keimzahlen, sondern nach 90 min stagniert die Keimzahl. Eine im Vergleich zu den Kontrollen etwas stärkere bakterizide Aktivität der Makrophagen ist bei der S. tm.-Gruppe also nur am 13. Tag festzustellen. Insgesamt scheint sich die Vorbehandlung mit S. tm. nur gering auf den Grad der Bakterizidie der Makrophagen auszuwirken, doch wird eine intrazelluläre Vermehrung der Salmonellen innerhalb der Beobachtungszeit von 120 min stets verhindert.

Zusammenfassend sei festgestellt, daß jede der Vorbehandlungen eine Auswirkung auf die Aktivität der Peritonealmakrophagen gezeigt hat, wobei allerdings erhebliche Unterschiede im Ausmaß oder der Art dieser Beeinflussung bestehen; der Einfluß ist am deutlichsten am 5. Tag erkennbar und ist am 20. Tag aufgehoben. Dies wird besonders deutlich in den in Abbildung 2 - 4 dargestellten Kurvenverläufen, die sich am 20. Tag angeglichen haben und auf fast gleichem Niveau parallel laufen.

Tab. 4: Mittelwerte der intrazellulären S. tm.-Konzentration in Prozent

Minuten	0	30	60	90	120
<u>5. Tag</u>					
Gruppen					
N	100	66	58	68	79
K-	100	61	47	47	57
K+	100	57	41	38	46
Y.e.	100	45	27	25	31
L.pl.	100	87	75	62	50
S.tm.	100	80	73	66	66
<u>13. Tag</u>					
Gruppen					
N	100	55	47	50	72
K-	100	63	50	40	40
K+	100	66	47	42	39
Y.e.	100	65	50	47	50
L.pl.	100	76	61	57	52
S.tm.	100	70	54	45	45
<u>20. Tag</u>					
Gruppen					
N	100	78	66	55	47
K-	100	68	54	50	50
K+	100	71	60	47	40
Y.e.	100	70	54	45	41
L.pl.	100	70	55	50	50
S. tm.	100	81	62	55	49

3.3.4. Entwicklung der Salmonellenzahlen in den Zentrifugationsüberständen

Die Salmonellen, die sich nach dem Waschen der aus der Peritonealspülflüssigkeit gewonnenen und im Kulturmedium resuspendierten Zellen zum Zeitpunkt null im Zentrifugationsüberstand nachweisen lassen, dürften zum ganz überwiegenden Teil von der Zelloberfläche abgelöste Keime sein. Sie sind der Wirkung des dem Kulturmedium zugesetzten Neomycin ausgesetzt. Dem entsprechend ist in den nach 30 bis 120 min untersuchten Kulturüberständen eine kontinuierliche Reduktion der Salmonellenzahlen zu erwarten. Die allein aus der Neomycinwirkung im zellfreien Kulturmedium resultierende Keimzahlkurve ist in der Abbildung 5 a-c dargestellt. Stellt man sie der graphischen Darstellung der Tabellen 18 bis 20 (Abbildung 5) gegenüber, lassen sich folgende Unterschiede zwischen dem Absterbeverhalten der Salmonellen im Zellsuspensionsüberstand und im zellfreien Kulturmedium feststellen: Während die Salmonellenkonzentration in den Zentrifugationsüberständen sehr rasch in den ersten 60 min abnimmt - im Mittel von 1.8×10^7 auf 2.6×10^5 (siehe Tabelle 17) - ist diese im neomycinhaltigen Medium ohne Zellen verzögert; in den ersten 30 min ist hier die Abnahme wesentlich geringer von 1.3×10^7 auf 7.2×10^6 (siehe Tabelle 21). Nach 30 min beginnt jedoch auch bei der Neomycinabsterbekurve eine starke Salmonellenreduktion, so daß sich die Kurven zum 60 min-Wert annähern. Die Keimzahlen der Zellsuspensionsüberstände zu diesem Zeitpunkt liegen teils unter, teils über den Werten der Neomycinabsterbekurve, ohne ein regelhaftes Verhalten erkennen zu lassen. Nach dem 60 min-Wert weichen die Kurven wieder voneinander ab; während die Neomycinabsterbekurve bis zum 120 min-Wert weiter steil abfällt, ist bei den Zellsuspensionsüberständen eine Abflachung zu beobachten. Im zellfreien Medium kommt es zum stetigen Absterben der Salmonellen, während die Keimzahl in Anwesenheit von Zellen nach 60 min sehr viel weniger stark verringert wird und nach 90 min ein Zunehmen der Keimzahl zu beobachten ist.

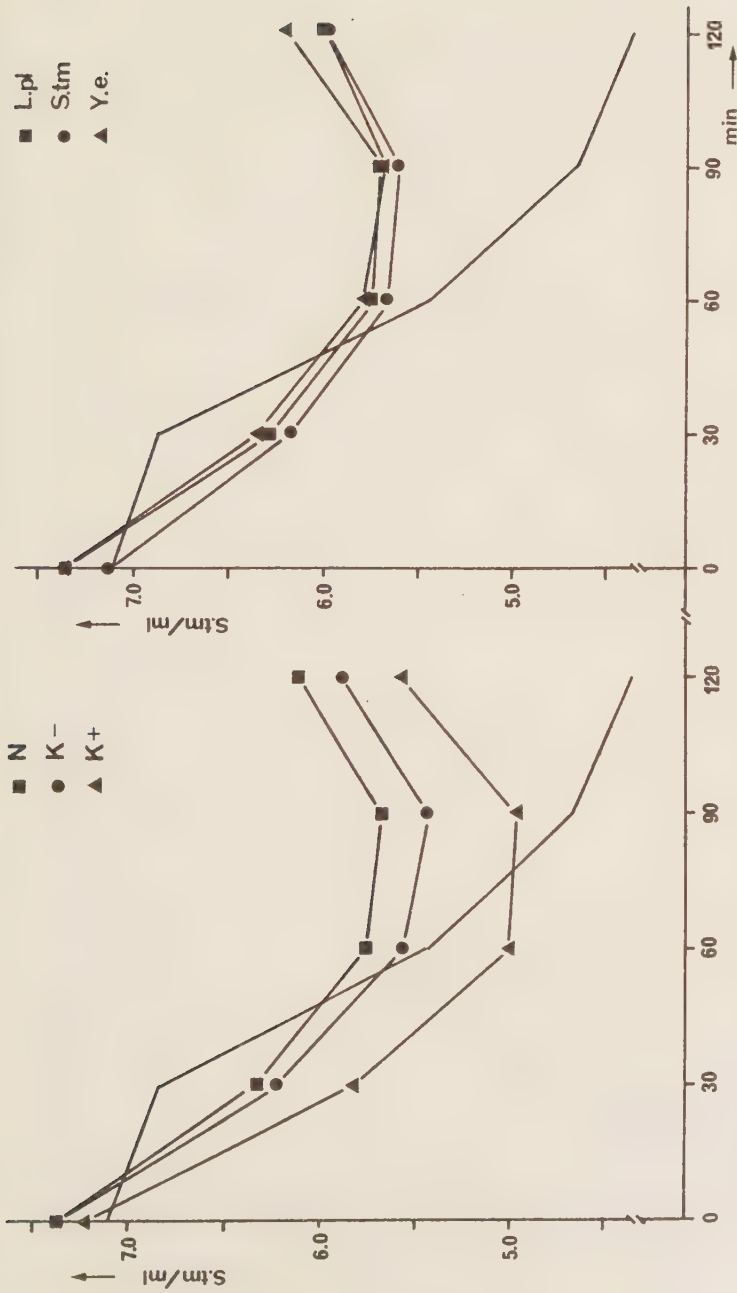


Abb. 5a: Kinetik der extrazellulären Salmonellenkonzentration (log-Werte) am 5. Tag p.i.
im Vergleich zur Neomycinabsterbekurve (—)

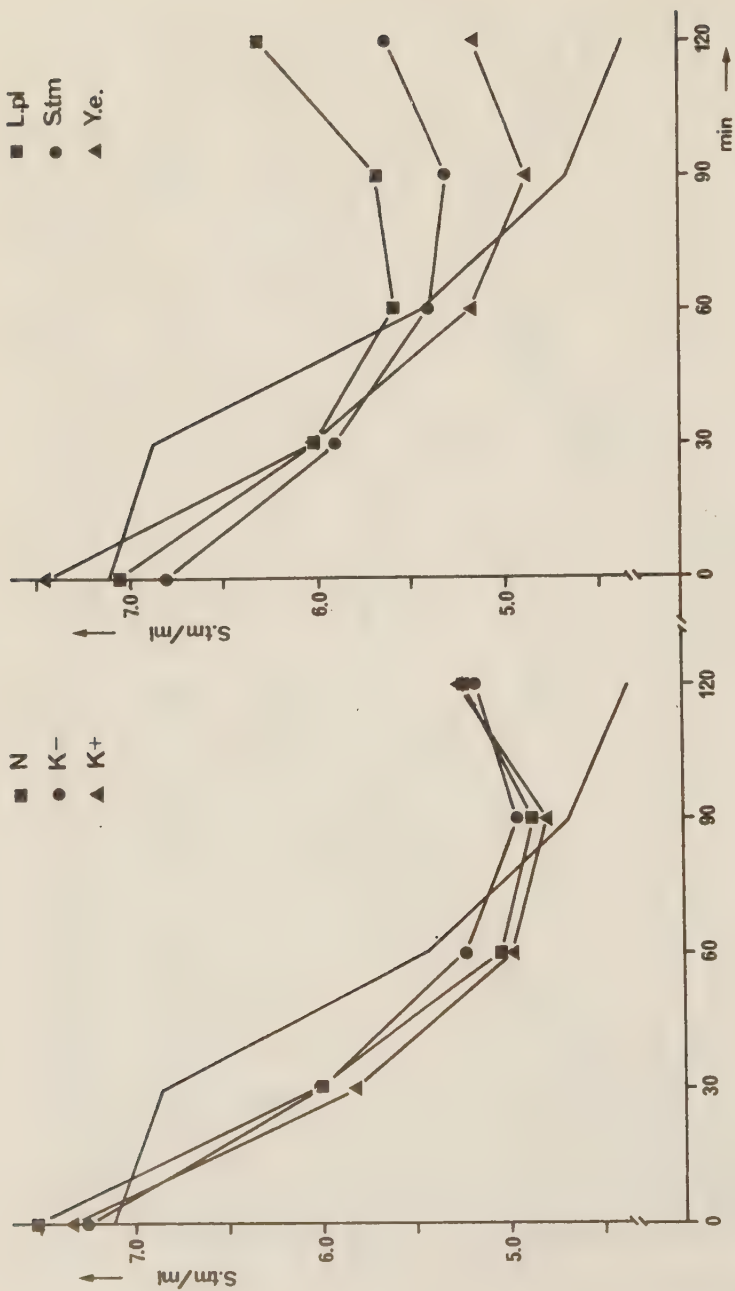


Abb. 5b: Kinetik der extrazellulären Salmonellenkonzentration (log-Werte) am 13. Tag p.i. im Vergleich zur Neomycinabsterbekurve (—)

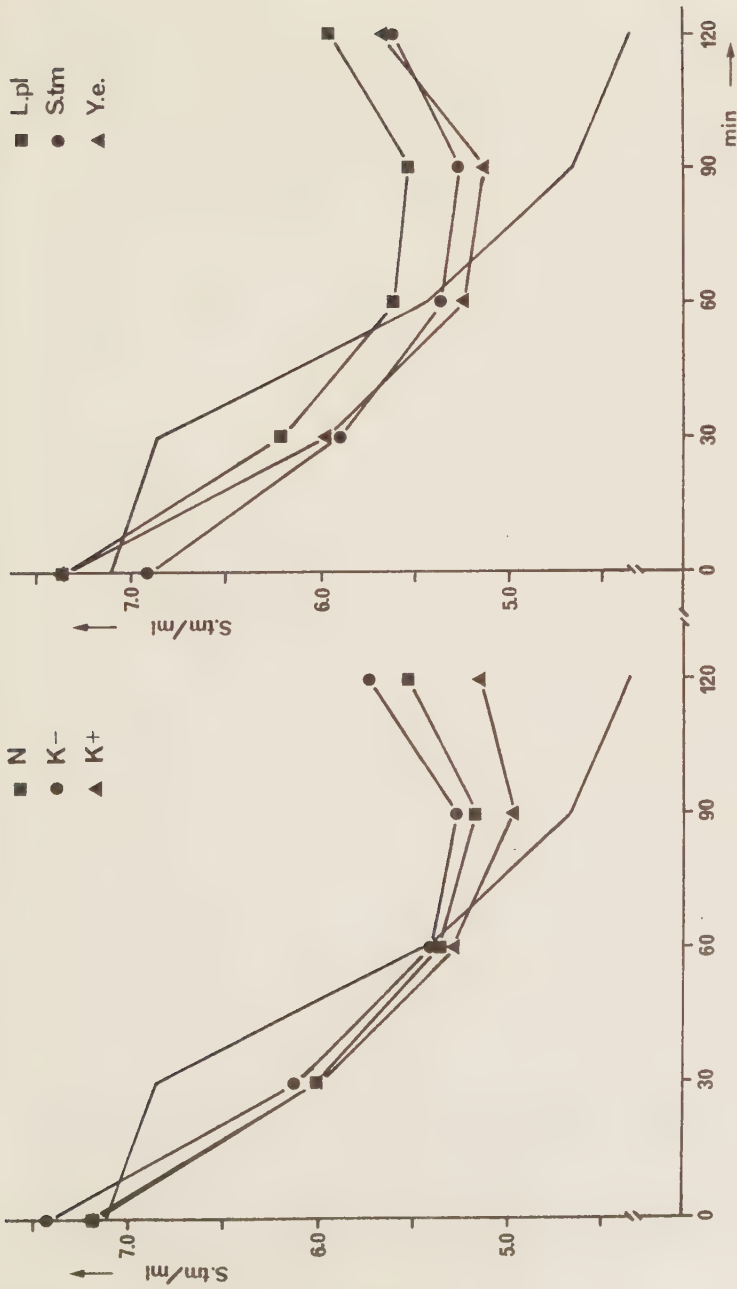


Abb. 5c: Kinetik der extrazellulären Salmonellenkonzentration (log-Werte) am 20. Tag p.i.
im Vergleich zur Neomycinabsterbekurve (—)

Im folgenden sollen die graphischen Darstellungen (Abbildung 5) der in den Zellsuspensionsüberständen ermittelten Keimzahlen im einzelnen beschrieben werden:

Die absoluten Keimzahlen im Überstand liegen zum Zeitpunkt null mit Werten zwischen $\log 6.81$ bis 7.52 (Mittel: $\log 7.27 = 1.8 \times 10^7$ pro ml) in der gleichen Größenordnung wie in der beschallten Zellsuspension, wo Werte zwischen $\log 7.15$ und 7.56 (Mittel: $\log 7.31 = 2.0 \times 10^7$ pro ml) gefunden werden. Daraus kann man entnehmen, daß sich nach dem Abzentrifugieren und Resuspendieren der Zellen extrazellulär im Kulturmedium annähernd gleich viel Salmonellen befinden wie von den Zellen phagozytiert worden sind.

Die in den folgenden 60 min unter der Einwirkung des Neomycins vonstatten gehende Reduzierung der extrazellulären Keime verringert ihre Zahl auf einen Wert zwischen $\log 4.98$ und $\log 5.79$ (im Mittel : $\log 5.41 = 2.5 \times 10^5$ Keime pro ml). Dies hat zur Folge, daß nach 60 min die Zahl der extrazellulären Salmonellen in der Kulturflüssigkeit erheblich geringer ist als die Zahl der zur gleichen Zeit intrazellulär liegenden vermehrungsfähigen Keime ($\log 6.97$ bis $\log 7.10$; im Mittel : $\log 7.04 = 1.1 \times 10^7$ pro ml). Diese Feststellung ist wichtig für die Beurteilung der Entwicklung der Zahl der extrazellulären Keime in der Folgezeit. Sie vermindern sich in den folgenden 30 min (60 bis 90 min) kaum noch, um dann wieder anzusteigen. Diese Kurvenkinetik läßt auf eine Freisetzung intrazellulär liegender Keime nach Ablauf von 60 min schließen. Sie dürfte auf eine Zerstörung von Makrophagen durch sich intrazellulär vermehrende Salmonellen zurückzuführen sein. Eine Vermehrung chemoresistent gewordener extrazellulärer Salmonellen kann ausgeschlossen werden, wie die Absterbekurve der in neomycinhaltigem Kulturmedium suspendierten Salmonellen zeigt. Die Keimzahlen im Überstand erreichen nach 120 min im Mittel $\log 5.68 = 4.8 \times 10^5$ Keime pro ml. Der Abstand zu der zu diesem Zeitpunkt intrazellulär vorhandenen vermehrungsfähigen Salmonellenzahl betrug im Mittel

$\log 2.00 = 10^2$ Keime pro ml. Die Differenz war also erheblich, so daß die Makrophagenzerstörung durch sich ungehemmt vermehrende Salmonellen mit nachfolgender Freisetzung derselben lediglich als Randerscheinung zu werten ist. Dies wird ferner dadurch bestätigt, daß die Zahl der Makrophagen, nach 120 min überprüft, dem 0 min-Wert entspricht.

Während die intrazellulär ermittelten Salmonellenzahlen eine Veränderung der bakteriziden Wirkung der Makrophagen im Verlauf der 20 Beobachtungstage erkennen lassen, ergibt sich aus der Kinetik der extrazellulären Keimzahlen während der 120 minütigen Beobachtungszeit in erster Näherung kein derartiger Hinweis. Eine Zerstörung der Makrophagen in Folge sich intrazellulär exzessiv vermehrender Salmonellen scheint demnach zwischen 60 und 90 min, vor allem aber zwischen 90 und 120 min an jedem Untersuchungstag stattzufinden. Die Intensität dieses Prozesses erfährt keine in eine bestimmte Richtung laufende Veränderung.

Man kann versuchen, auf dem Weg über eine vergleichende Betrachtung der Veränderungen, die die Keimzahlen innerhalb der Zellen im Verlaufe des 26-tägigen Untersuchungszeitraumes erfahren, mit den Keimzahlen im Kulturüberstand weitere Informationen über die bakteriziden Fähigkeiten der Makrophagen in den unterschiedlich vorbehandelten Gruppen zu gewinnen. Infolge der um Größenordnungen höheren intrazellulären Keimzahl können dabei jedoch lediglich Tendenzen sichtbar werden. Mit Ausnahme der L. pl.-Gruppe sind die Salmonellen im Kulturüberstand am Ende der Beobachtungszeit (120 min) am 5. Tag zahlreicher als am 13. und 20. Tag. Dies gilt ebenfalls für die intrazellulär liegenden Salmonellen, wiederum mit Ausnahme der L. pl.-Gruppe, aber auch der S. tm.-Mäuse. Somit läßt sich feststellen, daß in den Mäusegruppen, in deren Makrophagen sich die Salmonellen nach anfänglicher Reduzierung wieder vermehren, die extrazelluläre Keimzahl einen maximalen Wert erreicht. Damit erweist sich die Höhe

der extrazellulären Keimzahl als unmittelbar abhängig von der intrazellulären. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme über die Herkunft der extrazellulären Salmonellen aus Makrophagen, die infolge exzessiver Keimvermehrung zerfallen sind. Ebenso hohe Keimzahlen am Ende der Beobachtungszeit (intra- und extrazellulär) stellen sich am 13. und 20. Untersuchungstag nicht ein, da in diesen Versuchsabschnitten eine intrazelluläre Salmonellenvermehrung nicht mehr vorkommt.

Im Vergleich mit den anderen Gruppen nehmen die Keimzahlen, die in der L. pl.- und in der S. tm.-Gruppe ermittelt wurden, eine extreme Position ein. Bei der mit L. pl. vorbehandelten Gruppe sind die Differenzen zwischen intra- und extrazellulärer Keimzahl in jeder Versuchsphase geringer als bei allen anderen Gruppen. Auf der Basis der Mittelwerte gilt dies auch für die S. tm.-Gruppe. Daher kann man annehmen, daß sich in der L. pl.- und der S. tm.-Gruppe exzessive Keimvermehrungen, die den Untergang von Makrophagen zur Folge haben, weniger häufig ereignen, als in den anderen Gruppen.

3.3.5. Ergebnisse der Meßgenauigkeitsbestimmung

Die aus dem zehnfach-Versuch ermittelten Abweichungen der Einzelwerte des Bakterizidietestes sind

i.p. Dosis	: $\log x \pm 0.01$
Makrophagendichte	: $\log x \pm 0.08$
intrazelluläre Salmonellen	: $\log x \pm 0.08$
extrazelluläre Salmonellen	: $\log x \pm 0.15$

Die Variationskoeffizienten dieser Werte lauten:

i.p. Dosis	: VK = 0.09 %
Makrophagendichte	: VK = 0.6 %
intrazelluläre Salmonellen	: VK = 0.5 %
extrazelluläre Salmonellen	: VK = 0.8 %

3.4. Besprechung der Ergebnisse

3.4.1. Ergebnisse der Makrophagenaktivitätsbestimmung

Die hier durchgeführten Untersuchungen sollten die Auswirkung einer oralen Paramunisierung auf die Bakterizidie von Peritonealmakrophagen gegen *S. tm.* verfolgen. Zu Vergleichszwecken wurde gleichzeitig die Aktivität von Peritonealmakrophagen *S. tm.*-infizierter Mäuse bestimmt, bei Tieren also, bei denen erregerspezifische Immunitätsmechanismen induziert wurden.

Im Hinblick auf die Interpretation der Ergebnisse muß einfühend darauf hingewiesen werden, daß Makrophagen eine heterologe Population von Zellen darstellen. Die einzelnen Subpopulationen stellen dabei nicht nur verschiedene Reifestadien dar, sondern sind mit verschiedenen Funktionen ausgestattet (42); so unterscheiden sie sich unter anderem in ihrer Bakterizidie, im Tragen von Ia-Molekülen des Haupt-Histokompatibilitätssystems und in ihrer Phagozytoseaktivität. Letzteres ist möglicherweise mitbestimmend gewesen für die in den Vorversuchen beobachtete unregelmäßige Verteilung der Salmonellen auf die einzelnen Makrophagen. Diesbezüglich muß man ferner berücksichtigen, daß durch die hier praktizierte *in vivo* Phagozytose die einzelnen Makrophagen mit unterschiedlich großen Keimzahlen in Berührung gekommen sein dürften. Die ungleiche Phagozytoserate der einzelnen Makrophagen könnte die Feststellung feinerer Unterschiede der Makrophagenbakterizidie der unterschiedlich vorbehandelten Gruppen abträglich beeinflußt haben.

Durch die Opsonisierung der Salmonellen mit fötalem Kälberserum vor der *in vivo* Phagozytose ist die Mitwirkung wirtsabhängiger humoraler Faktoren auf die Phagozytose und die nachfolgende Keimabtötung ausgeschlossen worden. Dies ist insbesondere in Bezug auf die Makrophagenaktivität der durch eine

Salmonellen-Infektion sensibilisierten Mäuse zu unterstreichen, bei denen am 13. und 20. Untersuchungstag das Vorhandensein erregerspezifischer Antikörper vorausgesetzt werden muß.

Bei dem Versuch der Beurteilung der Makrophagenaktivität an Hand der in den unterschiedlich vorbehandelten Mäusegruppen ermittelten Veränderungen darf die erwähnte Heterogenität der Makrophagenpopulation nicht außer acht bleiben. Veränderungen in der bakteriziden Aktivität der überprüften Gesamtpopulation können sowohl auf Steigerung der bakteriziden Qualität als auch auf Verschiebungen in der Quantität einzelner unterschiedlich aktiver Subpopulationen beruhen.

Auch innerhalb der S. tm.-Suspensionen, die zur Phagozytose verabreicht wurden, ist von Unterschieden in der Virulenz der einzelnen Keime auszugehen; die Variation reicht von wenig virulenten Keimen, die im Organismus schnell absterben, bis zu hoch virulenten Keimen, die sich nach der Aufnahme durch Makrophagen in diesen vermehren können.

Die Kurven der Bakterizidiekinetik sollen im folgenden auf der Basis dieser beiden Voraussetzungen diskutiert werden:

1. Heterogenität der Makrophagenpopulation
2. Virulenzunterschiede der phagozytierten Keimpopulation.

Die hier durchgeführten Versuche erstrecken sich mit einer Dauer von 4 Wochen auf einen relativ großen Zeitraum, in dem die bei Versuchsbeginn etwa 6 Wochen alten Mäuse einen entscheidenden Entwicklungsprozeß, besonders im Hinblick auf die Ausreifung des Immunsystems, durchlaufen. Bei der Untersuchung der Kontrollgruppe ist eine Steigerung der Makrophagenaktivität innerhalb dieses Zeitraumes festzustellen. Dies drückt sich darin aus, daß die bakterizide Wirkung der Peritonealmakrophagen am 20. Versuchstag eine andere Kinetik zeigt als die der jüngeren Mäuse. Bei den letzteren ist der

Keiminaktivierungsprozeß nach 60 min abgeschlossen, beziehungsweise wird überlagert von einer Vermehrung virulenter Anteile der Salmonellenpopulation, die sich der bakteriziden Wirkung der Makrophagen entzieht. Diese Beobachtung wird auch von JENKIN und BERNACERRAF (1960) beschrieben. Bei den älteren Mäusen ist eine Veränderung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen festzustellen, die sich darin ausdrückt, daß zum einen mehr phagozytierte Salmonellen abgetötet werden, zum anderen während der Beobachtungszeit von 120 min keine intrazelluläre Keimvermehrung sichtbar wird. Die Ursache für diese Entwicklung der Kurven ist offensichtlich darin zu suchen, daß Makrophagen von älteren Tieren besser in der Lage sind, die Vermehrung des überlebenden, virulenten Erregeranteils zu unterdrücken. Diese Fähigkeit muß allerdings nicht quantitativ im Kurvenverlauf ihren Ausdruck finden, da eine nach 60 und 90 min immer noch andauernde Abtötung weniger virulenter Keime die Vermehrung des virulenten Erregeranteils kompensieren kann. In der Tat ist die Kurvenbewegung der in den Zentrifugationsüberständen nachweisbaren Keimzahlen 20 Tage nach Beendigung der Vorbehandlung nicht anders als nach 5 oder 13 Tagen. Demzufolge kommt es an jedem der untersuchten Tage zu einer Zunahme der extrazellulären Salmonellen nach 90 und 120 min, das heißt zu einem Zerfall von Makrophagen, die auf intrazelluläre Keimvermehrung zurückzuführen ist.

Gleichwohl ist an einer Aktivitätssteigerung der Peritonealmakrophagen der Kontrollmäuse im Verlauf des Untersuchungszeitraumes nicht zu zweifeln. Diese Behauptung steht im Einklang mit den Untersuchungen von LU und UNANUE (1982), die Funktionsunterschiede zwischen Makrophagen neugeborener und adulter Mäuse fanden. Sie stellten eine fehlende Homogenität der Makrophagenpopulation junger Mäuse fest, die sich in einer geringen Anzahl H_2 -Gen tragender, antigenpräsentierender Makrophagen ausdrückt, was eine weniger stark ausgeprägte T-zellabhängige Immunität zur Folge hat. Ohne diese Ia-tragenden Makrophagen kann keine Antigenpräsentation erfolgen, da

diese an Membranstellen gebunden ist, die durch den H_2I -Locus des Haupt-Histokompatibilitätssystems kodiert werden (40). Demzufolge sind neugeborene Mäuse einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt. Nach Wechselwirkung von Antigen und T-Lymphozyten können jedoch zum einen Ia-reiche Monozyten induziert werden (40), zum anderen können Ia-negative Makrophagen in Ia-positive durch Lymphokine oder Phagozytose überführt werden (75). Bei den vorbehandelten Gruppen ist die Verschiebung der maximalen Keimreduzierung auf das Ende der Inkubierungszeit beziehungsweise die Unterdrückung der intrazellulären Keimvermehrung innerhalb des Zeitraumes von 120 min schon am 5. oder 13. Tag zu beobachten. Dies läßt sich mit einer früher einsetzenden Reifung der Makrophagen durch den Antigenkontakt erklären.

Die vorbehandelten Gruppen lassen sich hinsichtlich ihrer Bakterizidie in zwei Gruppen aufteilen: Die Dreier-Gruppe aus Y. e., K+ und K- bestehend und die Zweier-Gruppe mit L. pl. und S. tm.. Die erste unterscheidet sich von der Kontrollgruppe durch eine deutlich stärkere Inaktivierung der phagozytierten Keime, es kommt allerdings, wie bei den Kontrollen, am 5. Versuchstag zu einer intrazellulären Keimvermehrung. Die Zweier-Gruppe zeigt eine im Vergleich zu den Kontrollen verzögerte Abnahme der phagozytierten Keime, jedoch bleibt eine Aufwärtsbewegung der Keimzahlkurven aus. Ob die intrazelluläre Keimvermehrung dort, wo sie nicht beobachtet wird, zu einem späteren Zeitpunkt doch noch einsetzt oder tatsächlich ausbleibt, braucht hier nicht erörtert werden. Das dieser Arbeit zugrunde liegende Modell betrifft nur einen kleinen Ausschnitt des gesamten Infektionsgeschehens und erlaubt keine Aussage darüber, ob durch das Behandlungsverfahren eine Salmonelleninfektion verhindert werden kann. WOHLFARTH (1983) belastete Mäuse, die mit gleichem Modus vorbehandelt worden waren, am 10. und 20. Tag nach der Vorbehandlung mit S. tm. auf oralem Weg. Durch bakteriologische Untersuchung von Darm und Milz prüfte er das Haften der Infektion. Es zeigten sich geringe Unterschiede zugunsten der vorbehandelten Gruppen.

Der Widerstand von fakultativ intrazellulären Bakterien, speziell auch von *S. tm.*, gegen das intrazelluläre Abtöten - von verschiedenen Autoren als Ausdruck der Virulenz angesehen (35) - hat verschiedene Ursachen. Die Mechanismen, die die Keime in den Vakuolen vor der Degeneration schützen, sind verschiedenartig. Zum einen wird der Schutz durch den Aufbau der Bakterienwand bewirkt. Große Anteile an komplexen Lipiden und/oder ein hoher Anteil an Lipopolysacchariden können den lytischen Effekt lysosomaler Enzyme hemmen (89). In Bezug auf *S. tm.* ist dieser Mechanismus auch von CARROL et al. (1979) beschrieben worden, die bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen virulente Salmonellen in den Phagosomen fanden. Von HART et al. (1972) wurden ähnliche Untersuchungen mit *M. tuberculosis*-infizierten Makrophagenkulturen durchgeführt und eine weitere Ursache für das Überleben phagozytierter virulenter Bakterien gefunden; die Keime waren in der Lage, die Fusion von Lysosomen und Phagosomen zu verhindern. Als Folge der nicht eingetretenen Phagolysosomenbildung kommt es zur Freisetzung von lebenden Bakterien. Dieser Mechanismus wurde ebenfalls für *B. abortus*, einige andere Mykobakterienspezies und für *N. asteroides* diskutiert (23). Für ähnliche Vorgänge in den hier untersuchten Makrophagenkulturen spricht die in 3.3.4., Seite 58, beschriebene Vermehrung der extrazellulären Salmonellenzahl.

Neben dieser am 5. Tag p.i. auftretenden Vermehrung der phagozytierten Salmonellen ist gleichzeitig bei der K+ und Y. e.-Gruppe ein Maximum der Bakterizidie festzustellen, das den weniger virulenten Anteil der applizierten Salmonellenpopulation betreffen dürfte. Nach den Ausführungen von BLANDEN et al. (1969) und MACKANESS (1970) wäre eine gesteigerte Bakterizidie am 12. bis 14. Tag zu erwarten gewesen, ebenso wie ein Phagozytosesteigerungsmaximum zwischen dem 11. und 16. Tag (96). Zieht man diese Ergebnisse zum Vergleich zu dieser Arbeit heran, so muß dem unterschiedlichen Immunisierungsmodus Rechnung getragen werden und der daraus resultierenden Abweichung des Untersuchungszeitpunktes nach der

Antigenverabreichung. In Bezug auf die Kinetik der Phagozytosesteigerung, die nur bei Applikation von Y. e. zu beobachten ist, stimmen die Ergebnisse mit denen von SCHULZE et al. (1973) überein. In ihren Versuchen verfolgten sie die Zeitkinetik der unspezifischen Phagozytoserate von abgetöteten Streptokokken nach an 10 aufeinanderfolgenden Tagen oral gegebenen, hitzeinaktivierten S. tm.. Dabei war die Phagozytoserate maximal zwischen dem 11. und 16. Tag nach der ersten Antigengabe gesteigert. Dies entspricht dem in diesem Versuch ermittelten Zeitpunkt; die Phagozytoserate der Y. e.-Gruppe war am 11. Tag nach der ersten Antigengabe maximal, während sie sich am 19. und 26. Tag nach der ersten Gabe der Versinien nicht signifikant von den Kontrollmäusen unterschied. Wie oben erwähnt, beschrieb auch MACKANESS (1970) zwischen dem 12. und 14. Tag die größte Veränderung der Peritonealmakrophagen in ihrer funktionalen Aktivität, dies bezog sich sowohl auf die Phagozytoserate als auch auf die Bakterizidie. BLANDEN et al. (1969) und MACKANESS (1970) verwendeten zur Stimulierung des MPS BCG-Keime respektive L. monocytogenes, mit denen sie Mäuse durch eine einmalige parenterale Applikation infizierten. Zieht man in Betracht, daß in dem vorliegenden Versuchsablauf eine mehrmalige orale Gabe der Keime über einen Zeitraum von 6 Tagen erfolgte, so liegt das hier ermittelte Bakterizidiemaximum der untersuchten Makrophagen am 11. Tag nach dem erstmaligen Antigenkontakt. Die Übereinstimmung dieser Ergebnisse läßt ferner die Vermutung zu, daß es auch bei einer oralen Gabe eines Antigens zu einer der parenteralen Applikation vergleichbar schnellen Stimulierung des MPS kommt, zumindest wenn es sich bei dem Antigen um Enterobacteriaceen handelt. Dies steht im Einklang mit der Aussage von SCHULZE (1972), der für die Steigerung der Phagozytoserate keinen deutlichen Unterschied zwischen oraler oder parenteraler Gabe von hitzeinaktiviertem Antigen fand.

Die im Gegensatz dazu äußerst geringe Bakterizidie der Makrophagen der S. tm.-Gruppe an dem gleichen Tag, die noch geringer ausfällt als die der Kontrollgruppe, läßt darauf schlie-

Ben, daß die Zeitkinetik der Makrophagenaktivierung bei einer *S. tm.*-Infektion anderen Einflüssen unterworfen ist. Hierauf soll später eingegangen werden (siehe Seite 73 und 74).

Da alle zur Vorbehandlung verwendeten Keime eine Beeinflussung der Makrophagenaktivität bewirkt haben - wenn auch mit graduellen Unterschieden - , sollen die Ergebnisse der einzelnen Gruppen im folgenden besprochen werden.

3.4.1.1. *Y. enterocolitica*

Die stärkste Steigerung ihrer Bakterizidie haben die Makrophagen durch die Vorbehandlung mit *Y. e.* erfahren. Aus orientierenden Untersuchungen von WOHLFARTH (1983) ließ sich eine einige Zeit anhaltende Infektion der Mäuse nach der oralen Gabe von *Y. e.* nachweisen; am 5. Tag p.i. war bei 10 von 10 Tieren der Keim aus dem Darm zu isolieren, am 20. Tag p.i. waren Yersinien noch bei 5 von 10 Tieren nachweisbar. Makrophagen von aktiv infizierten Tieren sind metabolisch aktiver und phagozytieren auch schneller als Makrophagen, die anders als durch eine Infektion stimuliert wurden, zum Beispiel durch Thioglycolat (23). Dabei spielt sicher eine nicht zu vernachlässigende Rolle, daß es sich bei der Infektion mit Yersinien um ein intrazellulär parasitierendes Bakterium handelt. Die bestehende Infektion mit *Y. e.* zum Zeitpunkt der Untersuchungen würde daher erklären, warum es bei dieser Gruppe zu einer gesteigerten Phagozytosekapazität kam, und eine so deutliche Steigerung der Bakterizidie zu verzeichnen war.

In den Versuchen von CORBEL (1975) wurde nachgewiesen, daß sich durch *Y. e.* aktivierte Resistenzmechanismen gegen *S. tm.*-Infektionen richten. Ein *Y. e.*-Stamm und eine *S. landau*-Rauhform, beide Formalin-inaktiviert, wurden Mäusen s.c. injiziert, mit einer Boosterung nach 2 und 4 Wochen. Eine i.p. Belastung mit lebenden *S. landau* führte bei keinem der mit *Y. e.* geimpften Tieren zum Tode, während bei den homolog

geimpften Tieren 5 von 7 starben. Diesen Schutz führt CORBEL (1975) auf spezifische somatische Antigendeterminanten zurück und will mit diesen Ergebnissen deren Wichtigkeit bei der Entwicklung einer Salmonellenimmunität unterstrichen wissen. Eine Antigenverwandtschaft zwischen *Y. e.* und *Salmonellen* (speziell auch *S. tm.*) besteht nach KOHN (1981) über Identität von Typ I-Fimbrien dieser beiden Spezies; diese Fimbrien stellen gleichzeitig ein Virulenzmerkmal dar (30, 54). Nach KUNIN (1962) gibt es ein gemeinsames Antigen (= CA, common antigen) aller Enterobacteriaceen, das demzufolge auch die beiden im Versuch verwendeten *E. coli*-Stämme einbezieht. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß lediglich der Antigenstimulus durch CA den von den beiden Keimen gezeigten Einfluß auf die Makrophagenaktivität bewirkt.

3.4.1.2. *E. coli* (K_{88} positiv und K_{88} negativ)

1981 untersuchte KIRCHNER die Schutzwirkung oraler Immunisierung mit einem hitzeinaktivierten *S. tm.*-Stamm auf die Infektion mit dem homologen Stamm und daneben die Wirkung eines K_{88} -tragenden *E. coli*-Stammes. Die *S. tm.*-Vakzine bewirkte zwar eine Keimzahlreduzierung in den Organen, verhütete jedoch nicht das Haften einer Infektion. Demgegenüber zeigte der oral applizierte, lebende *E. coli* gute Erfolge in Bezug auf die Abwehr einer Infektionshaftung. Bei der *E. coli*-Infektion kam es zu einer Ansammlung von Makrophagen in der Darmwand. Es ist anzunehmen, daß die dort ansässigen Makrophagen ebenfalls in ihrem Vorkommen und ihrer Effektivität gesteigert waren.

Untersuchungen über den Einfluß von Bakterienwandextrakten auf die Entwicklung einer nicht-spezifischen Resistenz haben gezeigt, daß eine apolare Lipidfraktion von *E. coli* isoliert, - Ubiquinone 8 (Q_8) - verantwortlich ist für die Schutzentwicklung vor einer anderenfalls letalen, parenteralen Belastungsinfektion sowohl mit gramnegativen - darunter auch

S. tm. - als auch grampositiven Bakterien (13). Dieser Schutz ging einher mit der Stimulation des MPS, sichtbar werdend in einer gesteigerten Clearance rate des Blutes und Keimzahlreduzierung in Milz und Leber sowie in einer erhöhten in vitro Erythrophagozytose von Peritonealmakrophagen. Diese Ergebnisse können mit der deutlichen Bakterizidiesteigerung der Makrophagen, die in diesem Versuch nach Vorbehandlung mit K₈₈-tragendem E. coli sichtbar wurde, in Verbindung gebracht werden. Sie ist der Wirkung des Stammes ohne Anheftungsfaktor deutlich überlegen. Dies könnte damit zusammenhängen, daß der Anheftungsfaktor auch bei Mäusen aktiv ist und einen engeren Kontakt mit der Darmwand vermittelt, so daß der Antigenstimulus zum einen stärker und zum anderen länger anhaltend ist; letzteres wird durch die oben erwähnten orientierenden Untersuchungen von WOHLFARTH (1983) ablesbar; am 5. Tag p.i. war bei 2 von 10 Tieren der K₈₈-tragende E. coli-Stamm zu isolieren, der K₈₈-negative Stamm bei keinem Tier. Daß der Keim ohne Anheftungsfaktor dennoch einen, wenn auch geringen Einfluß auf die Makrophagenaktivität ausüben konnte, läßt sich durch den als "sampling" des Darminhaltes beschriebenen Vorgang erklären (56). Dabei wird vom Darmlumen durch das Zytoplasma spezifischer epithelialer Zellen antigenetisches Material aufgenommen. Es erfolgt so ein Transport von Partikeln in einem System - zu dem unter anderem die Intestinalmakrophagen und die Peyer'schen Plaques zählen -, das dafür sorgt, daß so ein Kontakt zwischen diesem antigenetischen Material aus dem Darmlumen und immunkompetenten Zellen stattfindet (111). In diese Richtung weist auch das von SCHLEWINSKY et al. (1971) und VOLKHEIMER (1972) beschriebene Phänomen der Persorption, das den Übertritt korpuskulärer Teilchen durch die Schleimhaut des Dünndarmes beinhaltet. Dies gilt auch für die in diesem Versuch verwendeten L. pl.-Stämme.

3.4.1.3. *L. plantarum*

Die durch *L. pl.* erzielte Beeinflussung der Makrophagenaktivität drückt sich kaum in einer quantitativ gesteigerten Bakterizidie aus. Indessen kommt es an keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer intrazellulären Vermehrung der Salmonellen. Die auf eine Zerstörung von Makrophagen durch sich vermehrende Salmonellen zurückgeführte Zunahme der Salmonellenzahl in den Zentrifugationsüberständen ist allerdings auch bei den Mäusen der *L. pl.*-Gruppe festzustellen. Hier wäre aber nochmals darauf hinzuweisen, daß die extrazellulären Keime um Größenordnungen geringer sind als intrazelluläre, und daß sich in der *L. pl.*-Gruppe - wie auch in der *S. tm.*-Gruppe - exzessive, intrazelluläre Salmonellenvermehrungen, die den Untergang von Makrophagen zur Folge haben, weniger häufig ereigneten als in den anderen Gruppen (siehe Seite 59 und 60).

BLOCKSMA et al. (1981) erzielten durch parenterale Gabe von lebenden und hitzeinaktivierten *L. pl.*-Stämmen eine Resistenz gegen *L. monocytogenes*-Infektionen an Hand der Keimzahlreduzierung in der Milz und wies so - und an Hand der Carbon-Clearence des Blutes - eine Stimulierung des MPS nach. Sie verglichen diese Wirkung nach dem Einsetzen der Resistenz mit der von *C. parvum*. Während über die Wirkung von *L. pl.* wenig bekannt ist, ist der Einfluß von *C. parvum* von verschiedenen Autoren untersucht worden (18, 25, 73). Es zeigte sich in allen Versuchen eine gesteigerte Bakterizidie, in vivo wie in vitro, des MPS respektive der Peritonealmakrophagen im speziellen gegen *S. tm.* oder *S. enteritidis*.

Aus dem von mir durchgeführten Bakterizidietest ist nicht zu erkennen, ob eine Kontrolle der phagozytierten Salmonellen auch über den Untersuchungszeitraum von 120 min hinaus erfolgte. Es ist jedoch bemerkenswert, daß am 5. Tag nach der Vorbehandlung allein bei dieser Gruppe eine kontinuierliche Keimreduzierung stattfindet, während bei den übrigen vorbe-

handelten Gruppen eine zum Teil erhebliche Salmonellenvermehrung auftritt. Andererseits ist die maximale Bakterizidie geringer als bei den anderen Gruppen. Hier drängt sich die Annahme auf, daß sich die Makrophagenpopulation namentlich am 5. Tag in der mit L. pl. vorbehandelten Gruppe anders zusammensetzte. Interpretiert man die Veränderung der Kinetik der bakteriziden Aktivität der Peritonealmakrophagen am 13. und 20. Versuchstag bei den anderen Gruppen mit einem vom Alter der Mäuse abhängigen Reifungsprozeß der Makrophagen, hat die Vorbehandlung mit L. pl. diesen Vorgang beschleunigt. Wie bereits erörtert wurde, ist bei der Vorbehandlung mit Y. e. und E. coli K+ von einer Auseinandersetzung der lokalen Abwehrmechanismen im Bereich des Darmes mit diesen Keimen auszugehen, während für das Wirksamwerden der Applikation von L. pl. vornehmlich Mechanismen des Darmes in Betracht kommen dürften, die mit dem Begriff der Persorption umschrieben werden.

Offensichtlich bedarf es für das Zustandekommen der am 5. Versuchstag nachweisbaren Steigerung der bakteriziden Aktivität, die in den anderen Gruppen (Y. e. und K+) festzustellen war, bestimmter Veränderungen in der Makrophagenpopulation, die nur durch aktive Stimulierung der darmnahen, zellulären Infektionsabwehrmechanismen erreicht werden kann. Für die postulierte Beschleunigung der vom Lebensalter abhängigen Reifung des Immunsystems durch L. pl. dürfte dagegen eher die dieser Keimspezies auf der Grundlage der Antigenstruktur - ähnlich wie C. parvum - zugesprochenen makrophagenwirksame Adjuvanswirkung von Bedeutung sein.

3.4.1.4. S. typhimurium

Die Bakterizidie der Makrophagen der S. tm.-Gruppe ist zu keinem Zeitpunkt des Untersuchungszeitraumes deutlich größer als die der Kontrollgruppe. Eine vergleichende Betrachtung mit den Ergebnissen anderer Autoren erweist sich als schwierig, da zum einen andere Infektionsmodi - i.p.

Infektion (19) - gebraucht wurden, vor allem aber die zur Phagozytose applizierte Keimsuspension wie bei BLANDEN et al. (1966) mit Immenserum opsonisiert wurde. In dem hier praktizierten Test ist aus Gründen der Erkennbarkeit der Einflüsse der Paramunisierung eine Opsonisierung der Keime mit fötalem Kälberserum vorgenommen worden. Dennoch läßt sich anmerken, daß auch ZINKERNAGEL (1976) bei seinen Untersuchungen über die zellvermittelte Immunantwort gegenüber der S. tm.-Infektion bei Mäusen eine ungenügende Aktivierung von Makrophagen nach parenteraler Infektion mit S. tm. fand. Die Makrophagen zeigten nur geringe Bakterizidie gegenüber S. tm., indem sie das Wachstum der Keime zwar verzögerten, nicht aber zu kontrollieren vermochten. Welche Mechanismen dieser ungenügenden Makrophagenaktivierung zugrunde liegen, ist unklar. Nach TRUDGETT et al. (1973) ist nicht anzunehmen, daß eine fehlerhafte Makrophagenproduktion die Ursache ist, da kein Einfluß auf Makrophagenvorläuferzellen durch eine Infektion mit S. tm. festzustellen war.

Von verschiedenen Autoren ist über Suppressionsfaktoren berichtet worden (52). In Situationen, in denen Fremddantigen in großen Mengen in den Organismus eindringt, wie bei der in die diesem Versuch gesetzten Salmonelleninfektion, kann das Auftreten dieser Faktoren zur Ausbildung einer T-zellvermittelten Immunsuppression führen. Sie resultiert in einer Unfähigkeit sowohl DTH (Delayed Type Hypersensibility) als auch eine effektive zellvermittelte Immunität zu entwickeln (107). Das Auftreten von Suppressionsfaktoren könnte die Ursache für die beobachtete geringe bakterizide Wirkung der Peritonealmakrophagen am 5. Tag p.i. sein, zumal die gesetzte Infektion so schwer war, daß 10 bis 20 % der infizierten Tiere starben.

Der Suppressionsmechanismus wird offensichtlich durch die anhaltende orale Zufuhr von Salmonellen während der 6-tägigen Vorbehandlungsphase unterhalten. Zwischen dem Ende der Infektions-

phase und dem 13. Tag nach der Immunisierung scheint die Suppression aufgehoben zu werden; denn das Bakterizidiemaximum weist jetzt die gleichen Werte auf wie die Kontrollgruppen. Es ist also davon auszugehen, daß die Heftigkeit der gesetzten Infektion so stark ist, daß das Abwehrsystem nicht in der Lage ist, eine Population von Makrophagen mit gesteigerter bakterizider Aktivität zu etablieren. Wenn die Mäusegruppen, die mit *Y. e.* vorbehandelt worden sind, trotz heterologer Infektion eine Makrophagenpopulation entwickeln können, die der *S. tm.*-Gruppe in ihrer Bakterizidie überlegen ist, mag dies in der fehlenden Invasivität der *Y. e.*-Infektion begründet liegen, die sich auf Persistenz im Darm beschränkt (41) und nicht zu einer so starken Belastung des Abwehrsystems führt, wohl aber die Reaktion des darmnahen immunologischen aktiven Gewebes bewirkt.

3.4.2. Ergebnisse der Salmonellenzahlen in den Zentrifugationsüberständen

Die Entwicklung der Keimzahlen in den Zentrifugationsüberständen ist bereits bei der Darstellung der Ergebnisse kommentiert worden. An dieser Stelle soll folgendes hinzugefügt werden: Es fällt auf, daß in den ersten 30 min durch die Neomycinwirkung allein die Keimzahl weniger stark reduziert wird, als dies in den Zentrifugationsüberständen der Fall ist (Abbildung 5). Erst nach 60 min liegen die Keimzahlen in der reinen Neomycinsuspension im gleichen Bereich wie in den Zellüberständen. Demnach geht die Abtötung der extrazellulären Keime in den Zellüberständen in den ersten 30 min nicht allein auf die Neomycinwirkung zurück. In diesem Zusammenhang muß die Untersuchung von BLUMENSTOCK und JANN (1981) erwähnt werden, die die bakterizide Wirkung von Peritonealmakrophagen gegen *S. tm.* unterschiedlicher infektionsresistenter Mäuseinzuchtstämme prüften, wobei die Keime allerdings mit normalem Mäuseserum und nicht, wie in dem von mir durchgeführten Versuch, mit fötalem Kälberserum opsonisiert waren. Sie

stellten dabei folgendes fest: In den ersten 5 min nach Kontakt der Makrophagen mit den Salmonellen kommt es zu einer Abtötung von etwa 40 % der Salmonellen im Bereich der Plasmamembranen der Makrophagen noch vor der Phagozytose. Erst nach Ablauf dieser Zeit ist die Keimreduzierung eine Folge der bakteriziden Wirkung der Makrophagen im intrazellulären Raum. Da man davon ausgehen kann, daß die im Zentrifugationsüberstand befindlichen Salmonellen solche Keime sind, die sich erst im Anschluß an die Waschung der Makrophagen nach Aufnahme in das Kulturmedium von der Zelloberfläche gelöst haben, könnte die von BLUMENSTOCK und JANN (1981) beschriebene frühe bakterizide Wirkung im Verein mit der Neomycinwirkung für die rasche Abtötung der Salmonellen im Überstand während der ersten 30 min als Erklärung dienen. In diesen Prozeß könnte die Freisetzung von Mediatoren, wie lysosomale Enzyme, hineinspielen, die von Makrophagen sezerniert werden (16). Die zwischen 90 und 120 min eintretende Keimzunahme in den Zentrifugationsüberständen ist bereits an anderer Stelle (siehe Seite 60) mit dem Freiwerden von Salmonellen aus zerstörten Makrophagen, die infolge exzessiver Keimvermehrung zerfallen sind, in Verbindung gebracht worden. Ein solcher Zerfall hat sich zwar nicht durch einen Vergleich der Zellzahlen zum Zeitpunkt null und 120 min nachweisen lassen; aufgrund der hohen intrazellulären Keimzahl reicht schon ein mit dem Haemozytometer nicht erkennbare Zellverminderung aus, um eine deutliche Zunahme der extrazellulär befindlichen Bakterien zu bewirken, deren Zahl um Größenordnungen geringer ist als die der intrazellulären Salmonellen.

3.4.3. Schlußfolgerungen

Die Genauigkeit der Bestimmung der Phagozytoserate und der bakteriziden Wirkung der Peritonealmakrophagen ist möglicherweise beeinträchtigt durch die Tatsache, daß die einzelnen Makrophagen unterschiedlich viele Salmonellen phagozytiert haben. Darin spiegelt sich wahrscheinlich nicht nur eine Heterogenität der Makrophagenpopulation wider; vielmehr ist

anzunehmen, daß bei der von mir geübten Technik der in vivo Phagozytose das auf die einzelnen Phagozyten entfallende Angebot an Salmonellen teilweise recht ungleich groß war.

Die bei Versuchsbeginn etwa 6 Wochen alten Mäuse haben während der 26-tägigen Dauer des Versuches eine mit dem Lebensalter zunehmende Reifung des Immunsystems erfahren. Dieser Prozeß hat sich im Rahmen meiner Untersuchungen dadurch bemerkbar gemacht, daß die am 11. Tag des Versuches (5 Tage nach Abschluß der Vorbehandlung) festzustellende intrazelluläre Salmonellenvermehrung, die sich während der 120-minütigen Beobachtungszeit nach anfänglicher Keimreduzierung einstellte, am 20. Tag nach Abschluß der Vorbehandlung unterdrückt wurde. Die Ursachen hierfür können eine veränderte Zusammensetzung der Makrophagensubpopulationen oder Veränderungen der Eigenschaften dieser Zellen, also Änderungen qualitativer Art, oder beides sein. Diese Entwicklung ist durch die Vorbehandlung mit L. pl. beschleunigt worden; denn die Peritonealmakrophagen dieser Gruppe waren in der Lage, bereits am 11. Versuchstag (5 Tage nach Beendigung der Vorbehandlung) die Vermehrung der überlebenden phagozytierten Salmonellen innerhalb der Beobachtungszeit zu unterdrücken. Der Effekt der Vorbehandlung mit L. pl. kann mit der Adjuvanswirkung, die diesem Keim, ähnlich wie C. parvum, zugeschrieben wird, erklärt werden. Der zur Stimulierung der Makrophagen notwendige Antigenkontakt ist auf das Phänomen der Persorption zurückzuführen. Eine Besiedlung oder eine Infektion des Darmes durch L. pl. ist nicht anzunehmen.

Die Vorbehandlung mit Y. e. und - in geringerem Umfang - mit E. coli K+ hat zu einer Steigerung der Bakterizidie der Peritonealmakrophagen gegen S. tm. geführt. Die Ursache für diese Makrophagenaktivierung ist in der aktiven Auseinandersetzung der darmnahen zellulären Abwehrmechanismen mit diesen Keimen zu suchen. Wie von WOHLFARTH (1983) gezeigt worden ist, hat Y. e. und in geringem Grade auch E. coli K+ den Darm

besiedelt. Die beobachtete Aktivitätszunahme der Peritonealmakrophagen bei den mit *Y. e.* und K⁺ vorbehandelten Mäusen findet eine Parallele in den Ergebnissen der Untersuchungen von WOHLFARTH (1983). Dieser stellte fest, daß der Verlauf einer oralen Salmonelleninfektion nach Vorbehandlung mit den auch von mir benutzten Stämmen im Sinne einer Abschwächung modifiziert wurde. Dabei hatte auch in diesem Versuch die Vorbehandlung mit *Y. e.* einen stärkeren Effekt als die mit *E. coli* K⁺. Der *E. coli*-Stamm, dem der Anheftungsfaktor K₈₈ fehlte, führte ebenfalls eine Steigerung der bakteriziden Aktivität der Peritonealmakrophagen am 5. Tag nach Abschluß der Vorbehandlung herbei. Diese war jedoch schwächer ausgeprägt als nach der Gabe des K₈₈-Antigen tragenden *E. coli*-Stammes.

Die Resultate, die durch die Vorbehandlung der Mäuse mit dem virulenten *S. tm.*-Stamm erzielt wurden, lassen sich weniger gut interpretieren. Die so infizierten Tiere sollten als Kontrolle dienen, um zu zeigen, wie die spezifische Erkrankung im Vergleich zur Paramunisierung die Makrophagenaktivität beeinflußt. Dabei wurde wegen des angestrebten Vergleiches die Wirkung erregerspezifischer Antikörper, die freilich durch die Opsonisierung der Keime und ihre direkte bakterizide Aktivität wesentlichen Anteil an der spezifischen Erregerabwehr durch phagozytierende Zellen haben, ausgeschaltet (Opsonisierung der Salmonellen vor der Injektion in die Bauchhöhle mit fötalem Kälberserum). Obwohl davon ausgegangen werden kann, daß die orale Verabreichung von 10⁷ Keimen des für die Versuche verwendeten *S. tm.*-Stammes für die Dauer von 6 Tagen mit dem Trinkwasser eine mindestens kurzzeitige Infektion aller Mäuse herbeigeführt hat (110), war eine Steigerung der bakteriziden Wirkung der Makrophagen am 5. Tag nach Abschluß der Vorbehandlung nicht nachzuweisen. Zu keinem Zeitpunkt des Versuches war die bakterizide Wirkung der Peritonealmakrophagen der mit Salmonellen vorbehandelten Tiere deutlich größer als die der Kontrollen. Die einzig

nachweisbare Wirkung der Vorbehandlung mit Salmonellen war das Ausbleiben der Vermehrung der überlebenden phagozytierten Salmonellen am 5. Tag nach Abschluß der Vorbehandlung. Insofern hatte die Salmonella-Infektion auf die Antikörper-unabhängige Makrophagenaktivität einen ähnlichen Einfluß wie die Vorbehandlung mit L. pl., der ein Adjuvanseffekt zugeschrieben wurde. Zweifellos kann davon ausgegangen werden, daß der durch den S. tm.-Stamm ausgelöste Infektionsprozeß heftiger war als der durch Y. e. bewirkte. Daher kann von einer sehr viel stärkeren Inanspruchnahme des darmnahen zellulären Abwehrsystems nach der Salmonella-Infektion ausgegangen werden. Auf dieser Basis können Erklärungsmöglichkeiten für das Fehlen der bei den Y. e.- und E. coli-Gruppen beobachteten Steigerung der bakteriziden Wirkung der Peritonealmakrophagen gesucht werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde geprüft, welchen Einfluß eine orale Paramunisierung mit vermehrungsfähigen Keimen auf die Bakterizidie von Mäuseperitonealmakrophagen gegen *S. typhimurium* hat.

Es wurden ein *Y. enterocolitica*-Stamm, zwei *E. coli*-Stämme - von denen einer den K_{88} -Anheftungsfaktor trug - und ein Gemisch aus zwei *L. plantarum*-Stämmen verwendet. In einer weiteren Versuchsgruppe wurde die Aktivität von Peritonealmakrophagen bei Tieren untersucht, die oral mit dem *S. typhimurium*-Stamm infiziert worden waren, der im Bakterizidietest verwendet wurde.

Die bakterizide Wirkung der Peritonealmakrophagen gegenüber *S. typhimurium* wurde nach 10 min in vivo Phagozytose in vitro über 2 Stunden beobachtet. Die Überprüfung erfolgte am 5., 13. und 20. Tag nach Abschluß der Vorbehandlung.

Die Vorbehandlung wirkte sich auf die so ermittelte Aktivität der Mäuseperitonealmakrophagen verschiedenartig aus.

Eine bei den Kontrolltieren im Verlaufe der dreimaligen Überprüfung festgestellte Aktivitätsänderung der Peritonealmakrophagenpopulation, die als Folge einer immunologischen Reifung gedeutet wurde, wurde durch die Vorbehandlung mit *L. plantarum* beschleunigt. Der immunologische Reifungsprozeß drückte sich in der Fähigkeit dieser Zellen aus, eine innerhalb der Beobachtungszeit von 2 Stunden sichtbar werdende Zunahme intrazellulär überlebender *S. typhimurium*-Keime zu unterdrücken. Diese Fähigkeit besaßen die Makrophagen der Kontrollmäuse erst am 26. Versuchstag.

Eine deutliche Steigerung der Bakterizidie der Peritonealmakrophagen, die sich am 5. Tag nach Abschluß der Vorbehandlung manifestierte, war nach Paramunisierung mit *Y. enterocolitica*

und - in etwas geringerem Umfang - mit dem K₈₈-tragenden E. coli-Stamm zu beobachten. Die Beeinflussung der Makrophagenaktivität durch den zweiten, den Anheftungsfaktor nicht tragenden E. coli-Keim fiel dagegen geringer aus.

Die Überprüfung der Makrophagenaktivität S. typhimurium-infizierter Mäuse ergab, daß die Bakterizidie gegenüber S. typhimurium zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen größer war, als die der Kontrollgruppe. Dieser Befund wurde mit der Aktivierung von Suppressionsmechanismen durch die Infektion in Verbindung gebracht, die die Entwicklung einer Peritonealmakrophagenpopulation mit gesteigerter Gesamtbakterizidie innerhalb der Beobachtungszeit unterdrückt haben.

5. SUMMARY

The present study investigated the influence of oral paramunization with live bacteria on the bactericidal activity of peritoneal macrophages of mice against *S. typhimurium*.

The strains used for paramunization were: a strain of *Y. enterocolitica* strain, two *E. coli* strains - one bearing colonization factor K_{88} - and a combination of two *L. plantarum* strains. The activity of peritoneal macrophages of orally *S. typhimurium* infected mice was studied in a further group, using the same *S. typhimurium* strains as in the later performed "bactericidal activity assay".

The bactericidal effect of peritoneal macrophages on *S. typhimurium* was monitored in vitro for 2 hours, after 10 minutes of in vivo phagocytosis. The killing assay was performed on days 5, 13 and 20 after the pretreatment.

The pretreatment influenced the activity of the peritoneal macrophages in different ways.

The change in the macrophage activity observed in the control group, interpreted as a process of immunological maturation, was increased by pretreatment with the *L. plantarum* strains.

This process of immunological maturation was expressed by the ability of the cells to suppress the intracellular growth of surviving *S. typhimurium* during the 2 hours of observation. This ability was achieved by macrophages of control mice only on day 26 of the test.

A distinct increase of bactericidal activity of the peritoneal macrophages manifested on day 5 following pretreatment, was achieved by using *Y. enterocolitica* and - to only a less degree - the K_{88} bearing *E. coli* strain for paramunization. The influence of the *E. coli* strain lacking the colonization

factor K_{88} was poorer.

The bactericidal activity of peritoneal macrophages of mice infected with *S. typhimurium* was at no time during the investigation higher than that of control mice. This finding was probably due to activation of suppression-mechanisms by infection with *S. typhimurium*, causing a lack in developing a population of peritoneal macrophages with an enhanced bactericidal capacity.

6. TABELLEN

- Tab. 5: Mittelwerte der Keimdosen der Vorbehandlung
Tab. 6: Phagozytoseraten
Einzelergebnisse des Bakterizidietestes der Gruppe
Tab. 7: KONTROLLE
Tab. 8: K₈₈ NEGATIV
Tab. 9: K₈₈ POSITIV
Tab. 10: YERSINIA ENTEROCOLITICA
Tab. 11: LACTOBACILLUS PLANTARUM
Tab. 12: SALMONELLA TYPHIMURIUM
Tab. 13: Mittelwerte der intrazellulären
Salmonellenzahl/ml, 5. Tag
Tab. 14: 13. Tag
Tab. 15: 20. Tag
Tab. 16: Mittelwerte der extrazellulären
Salmonellenzahl/ml, 5. Tag
Tab. 17: 13. Tag
Tab. 18: 20. Tag
Tab. 19: Werte der intrazellulären Salmonellenzahl, ge-
mittelt aus den Tagen 5, 13 und 20 aller Gruppen
Tab. 20: Werte der extrazellulären Salmonellenzahl, ge-
mittelt aus den Tagen 5, 13 und 20 aller Gruppen
Tab. 21: Neomycinabsterbekurve

Für die folgenden Tabellen geltende Abkürzungen:

N	Kontrollgruppe
K-	K ₈₈ negativ vorbehandelte Gruppe
K+	K ₈₈ positiv vorbehandelte Gruppe
Y.e.	Yersinia enterocolitica vorbehandelte Gruppe
L.pl.	Lactobacillus plantarum vorbehandelte Gruppe
S.tm.	Salmonella typhimurium vorbehandelte Gruppe
x. Tag	x. Tag nach der Vorbehandlung
i.p.	intraperitoneal applizierte Salmonellendosis
Zellz.	Anzahl der Makrophagen pro ml Kulturmedium
I - IV	Versuchsansatz Nr. 1 bis 4
Std. Abw.	Standardabweichung vom Mittelwert

Tab. 5: Mittelwerte der Keimdosen der Vorbehandlung (log Werte)

	K+	K-	Y.e.	L.pl.	S.tm.	
I	7.08	7.14	7.07	7.20	7.00	
II	7.17	7.14	7.00	7.20	7.04	(Keime/ml/Tag)
III	7.20	7.07	7.11	7.20	7.04	
IV	7.20	7.17	7.00	7.20	7.04	

Tab. 6: Phagozytoseraten (Salmonellen/Makrophage)

5. Tag	N	K-	K+	Y.e.	L.pl.	S.tm.
I	30	21	25	53	17	13
II	14	11	24	44	22	9.6
III	17	15	16	40	12	15
IV	25	24	15	35	9	14
13. Tag	N	K-	K+	Y.e.	L.pl.	S.tm.
I	13	16	24	16	12	15
II	25	18	30	29	20	14
III	12	16	15	11	23	34
IV	19	20	12	21	16	28
20. Tag	N	K-	K+	Y.e.	L.pl.	S.tm.
I	11	18	11	25	22	8
II	11	15	8	20	19	10
III	10	24	17	36	17	12
IV	17	19	20	15	14	21

Tab. 7: Einzelergebnisse des Bakterizidietestes der Gruppe

KONTROLLE

	i. p.	Zellz.	intrazelluläre S. tm./ml					extrazelluläre S. tm./ml					
			min	0	30	60	90	120	min	0	30	60	90
5. Tag	I	9.04	6.08	7.55	7.17	7.20	7.30	7.57	7.46	6.04	5.32	5.64	5.64
	II	9.04	6.08	7.23	7.39	7.34	7.07	7.04	7.38	6.60	5.72	6.04	6.30
	III	8.95	6.04	7.27	7.04	7.07	7.07	7.20	7.23	6.76	4.88	5.43	5.83
	IV	9.00	6.14	7.55	7.25	7.11	7.17	7.39	7.39	6.51	5.69	6.00	6.25
13. Tag	I	8.94	6.11	7.23	6.98	6.82	6.83	7.11	7.49	6.27	4.69	4.96	4.80
	II	9.07	6.00	7.39	7.20	7.17	7.00	7.41	7.85	5.73	4.11	4.97	5.27
	III	8.95	6.04	7.14	7.00	6.87	6.89	7.00	7.85	5.73	4.11	4.97	5.27
	IV	8.94	6.00	7.27	7.07	6.93	7.00	7.07	7.23	6.47	5.78	5.50	6.30
20. Tag	I	9.11	5.99	7.04	6.80	6.69	6.66	6.64	6.84	5.70	4.30	4.46	4.41
	II	9.07	6.14	7.20	7.14	7.14	7.07	6.78	7.25	6.34	5.38	5.34	5.49
	III	8.95	6.23	7.25	7.00	7.00	6.81	6.68	7.07	6.36	4.94	5.74	6.04
	IV	9.11	6.04	7.27	7.17	7.11	7.11	7.17	7.44	6.50	5.71	6.00	6.00

Tab. 8: Einzelergebnisse des Bakterizidietestes der Gruppe

K₈₈ NEGATIV

	i. p.	Zellz.	intrazelluläre S. tm./ml					extrazelluläre S. tm./ml					
			min	0	30	60	90	120	min	0	30	60	90
5. Tag	I	9.04	7.41	7.34	7.11	7.04	7.11	7.44	6.43	5.84	5.74	5.62	5.62
	II	8.94	7.17	7.14	6.81	6.96	7.00	7.25	6.17	5.27	5.20	5.39	5.39
	III	8.94	7.56	7.32	7.26	7.25	7.34	7.63	6.55	6.11	5.88	6.56	6.56
	IV	8.94	7.17	6.93	6.84	6.87	6.98	6.98	5.97	5.04	4.85	5.67	5.67
13. Tag	I	8.93	7.17	6.84	6.83	6.66	6.74	7.07	5.98	5.00	4.57	4.39	4.39
	II	9.14	7.30	7.00	7.00	6.92	7.00	7.11	6.17	4.81	4.66	5.07	5.07
	III	8.94	7.36	7.16	7.11	6.96	6.96	7.23	6.14	4.84	4.93	5.17	5.17
	IV	8.94	7.39	7.23	7.07	7.04	6.87	7.30	6.60	5.38	5.90	6.11	6.11
20. Tag	I	9.14	7.43	7.20	7.17	7.14	7.11	7.36	6.77	5.14	4.95	5.14	5.14
	II	9.14	7.34	7.04	6.97	6.97	6.94	7.17	5.98	4.76	4.46	5.79	5.79
	III	9.07	7.43	7.17	7.17	7.00	7.08	7.27	6.91	5.54	5.53	5.93	5.93
	IV	9.07	7.27	7.20	7.17	7.04	7.11	7.32	6.43	5.20	6.07	6.44	6.44

Tab. 9: Einzelergebnisse des Bakterizidietestes der Gruppe

K₈₈ POSITIV

	i. p.	Zellz.	intrazelluläre S. tm./ml				extrazelluläre S. tm./ml					
			min	0	30	60	90	120	min	0	30	60
5. Tag	I	8.95	7.44	7.27	6.83	6.85	6.95	7.14	5.99	4.74	4.98	5.60
	II	9.00	7.38	7.14	6.94	6.92	7.23	7.30	6.25	5.17	5.20	5.81
	III	9.04	7.20	7.07	6.94	6.93	6.88	7.20	5.80	4.27	4.38	5.60
	IV	9.14	7.23	7.07	7.00	6.87	6.98	7.17	6.60	5.25	4.93	5.67
13. Tag	I	9.17	7.43	7.25	7.11	7.14	7.11	7.17	6.00	4.78	4.43	5.17
	II	8.93	7.44	7.11	7.04	6.87	6.83	7.17	6.86	4.73	4.71	5.07
	III	8.94	7.27	7.17	7.00	7.00	6.83	6.98	6.32	4.34	4.30	4.88
	IV	8.94	7.23	7.07	6.92	6.96	6.86	7.07	6.57	4.60	5.27	6.38
20. Tag	I	9.04	7.00	6.95	6.73	6.74	6.60	6.87	5.99	4.43	4.43	4.43
	II	9.07	7.04	6.96	7.20	6.96	6.70	7.14	6.62	5.87	5.87	5.14
	III	8.96	7.27	6.96	6.74	6.60	6.65	7.39	6.04	4.53	4.53	4.49
	IV	9.04	7.34	7.23	7.07	7.07	7.04	7.39	6.11	5.20	5.98	6.38

Tab. 10: Einzelergebnisse des Bakterizidietestes der Gruppe
YERSINIA ENTEROCOLITICA

	i. p.	Zellz.	intrazelluläre S. tm./ml					extrazelluläre S. tm./ml					
			min	0	30	60	90	120	min	0	30	60	90
5. Tag	I	8.95	7.77	7.49	7.25	6.99	7.36	7.43	6.81	5.36	5.85	6.32	
	II	9.17	7.72	7.23	7.25	7.04	7.26	7.43	6.07	5.61	5.49	6.04	
	III	8.90	7.60	7.14	7.04	7.00	7.11	7.04	6.39	5.20	5.98	6.17	
	IV	8.90	7.54	7.30	7.14	7.07	7.04	7.32	6.79	5.88	5.99	6.34	
13. Tag	I	8.93	7.30	7.23	7.20	6.98	7.25	7.11	6.30	5.14	4.44	5.41	
	II	9.14	7.46	7.20	7.20	6.94	7.13	7.64	6.64	4.71	4.58	5.07	
	III	8.97	7.17	7.11	6.83	6.77	6.89	7.00	6.83	4.41	4.44	4.70	
	IV	8.86	7.32	7.04	7.00	6.91	7.00	7.20	6.65	5.23	5.53	6.04	
20. Tag	I	9.14	7.38	7.20	7.25	7.07	7.07	7.20	6.14	4.72	4.54	5.34	
	II	9.14	7.38	7.17	6.97	7.04	7.00	7.11	6.57	4.82	4.54	5.30	
	III	9.07	7.55	7.69	7.23	7.23	7.20	7.34	6.30	5.14	5.41	6.27	
	IV	9.00	7.23	7.07	6.96	6.91	6.90	7.27	6.46	5.56	5.66	6.23	

Tab. 11: Einzelergebnisse des Bakterizidietestes der Gruppe
LACTOBACILLUS PLANTARUM

	i.p.	Zellz.	intrazelluläre S. tm./ml					extrazelluläre S. tm./ml						
			min	0	30	60	90	120	min	0	30	60	90	120
5. Tag	I	8.96	7.27	7.27	7.17	7.04	7.00	7.00	7.25	7.00	5.83	5.95	6.38	
	II	8.89	7.39	7.39	7.30	7.17	7.15	7.15	7.20	6.99	5.56	5.56	6.39	
	III	8.86	7.14	7.11	7.02	6.76	6.69	6.69	7.17	6.60	5.49	5.30	6.11	
	IV	9.07	7.00	6.97	6.94	6.91	6.90	6.90	7.11	6.76	5.34	5.39	5.84	
13. Tag	I	9.04	7.17	7.17	6.99	6.96	6.88	6.88	6.96	5.71	5.00	5.46	5.69	
	II	8.98	7.43	7.36	7.23	7.23	7.17	7.17	6.96	5.97	5.81	5.81	6.27	
	III	9.11	7.47	7.30	7.20	7.25	7.25	7.25	7.20	6.11	5.85	6.11	6.59	
	IV	8.97	7.25	7.14	7.07	6.97	7.00	7.00	7.11	6.64	5.53	5.44	5.76	
20. Tag	I	8.95	7.34	7.23	7.11	7.11	7.00	7.00	7.14	6.97	5.34	5.34	6.04	
	II	9.04	7.32	7.23	7.00	7.07	7.07	7.07	7.34	6.07	5.11	5.25	6.07	
	III	9.04	7.39	7.27	7.04	7.07	7.11	7.11	7.43	7.04	5.95	6.00	6.44	
	IV	8.92	7.20	7.04	6.93	6.93	6.81	6.81	6.92	6.69	5.14	5.23	5.70	

Tab. 12: Einzelergebnisse des Bakterizidietestes der Gruppe

SALMONELLA TYPHIMURIUM

	i. p.	Zellz.	intrazelluläre S. tm./ml				extrazelluläre S. tm./ml							
			min	0	30	60	90	120	min	0	30	60	90	120
5. Tag	I	8.87	6.08	7.20	7.15	7.14	6.99	7.07	7.11	6.43	5.85	5.81	6.07	
	II	8.90	6.00	6.98	6.97	6.81	6.79	6.98	6.94	6.47	5.77	5.86	6.17	
	III	8.88	6.08	7.27	7.20	7.20	7.14	7.11	6.94	6.36	5.25	5.25	5.68	
	IV	8.94	6.08	7.22	7.45	6.94	6.83	6.99	7.17	6.41	5.36	5.30	6.25	
13. Tag	I	8.97	6.00	7.17	7.11	7.07	7.04	6.98	7.00	6.70	5.14	5.27	5.55	
	II	8.89	5.99	7.14	6.93	6.80	6.83	6.73	6.46	5.79	5.04	5.39	5.32	
	III	9.04	6.11	7.65	7.53	7.32	7.23	7.30	6.69	6.39	5.11	5.00	5.68	
	IV	9.00	6.14	7.60	7.50	7.30	7.29	7.17	7.25	6.23	5.32	5.50	6.25	
20. Tag	I	8.89	6.30	7.23	7.15	7.00	6.99	6.97	6.93	6.36	5.14	5.34	5.78	
	II	8.99	6.17	7.20	7.17	7.11	6.96	6.94	6.75	5.74	4.83	5.07	5.74	
	III	9.04	6.04	7.14	6.89	6.79	6.78	6.69	6.67	6.34	5.57	5.30	5.82	
	IV	8.95	6.04	7.38	7.23	7.20	7.17	6.97	6.91	6.41	5.25	5.25	5.46	

Tab. 13: Mittelwerte der intrazellulären Salmonellenzahl/ml, 5. Tag (log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
N	7.39	7.22	7.15	7.17	7.29	
K-	7.34	7.14	7.03	7.02	7.10	
K+	7.33	7.08	6.94	6.91	6.99	0.04 - 0.06
Y.e.	7.65	7.31	7.11	7.07	7.17	
L.pl.	7.21	7.16	7.09	7.01	6.91	
S.tm.	7.20	7.10	7.03	7.00	7.00	

Tab. 14: Mittelwerte der intrazellulären Salmonellenzahl/ml, 13. Tag (log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
N	7.27	7.03	6.93	6.96	7.13	
K-	7.28	7.09	6.96	6.89	6.89	
K+	7.33	7.16	7.03	6.95	6.92	0.04 - 0.06
Y.e.	7.32	7.12	7.01	6.98	7.03	
L.pl.	7.33	7.22	7.14	7.09	7.07	
S.tm.	7.39	7.25	7.14	7.07	7.04	

Tab. 15: Mittelwerte der intrazellulären Salmonellenzahl/ml, 20. Tag (log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
N	7.17	7.06	6.97	6.89	6.82	
K-	7.35	7.19	7.08	7.04	7.06	
K+	7.15	7.03	6.93	6.83	6.75	0.04 - 0.06
Y.e.	7.39	7.24	7.13	7.06	7.03	
L.pl.	7.31	7.16	7.06	7.01	7.00	
S.tm.	7.23	7.12	7.03	6.95	6.90	

Tab. 16: Mittelwerte der extrazellulären Salmonellenzahl/ml, 5. Tag
(log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
N	7.37	6.32	5.76	5.69	6.11	
K-	7.34	6.22	5.58	5.44	5.79	
K+	7.33	5.83	5.03	4.96	5.59	0.1 - 0.2
Y.e.	7.37	6.29	5.75	5.72	6.22	
L.pl.	7.38	6.35	5.79	5.70	6.06	
S.tm.	7.13	6.18	5.68	5.61	5.99	

Tab. 17: Mittelwerte der extrazellulären Salmonellenzahl/ml, 13. Tag
(log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
N	7.52	6.02	5.14	4.88	5.23	
K-	7.25	5.99	5.22	4.95	5.17	
K+	7.33	5.83	4.98	4.79	5.25	0.1 - 0.2
Y.e.	7.46	6.04	5.18	4.89	5.17	
L.pl.	7.07	6.05	5.59	5.68	6.32	
S.tm.	6.81	5.90	5.40	5.31	5.64	

Tab. 18: Mittelwerte der extrazellulären Salmonellenzahl/ml, 20. Tag
(log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
N	7.19	6.03	5.36	5.19	5.53	
K-	7.43	6.13	5.42	5.29	5.75	
K+	7.23	6.02	5.28	4.99	5.16	0.2 - 0.3
Y.e.	7.38	5.99	5.25	5.15	5.69	
L.pl.	7.37	6.23	5.62	5.54	5.97	
S.tm.	6.92	5.92	5.37	5.28	5.64	

Tab. 19: Werte der intrazellulären Salmonellenzahl, gemittelt aus den Tagen 5, 13 und 20 aller Gruppen (log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
N	7.28	7.11	7.02	7.01	7.08	0.04 - 0.06
K-	7.32	7.14	7.02	6.98	7.02	
K+	7.27	7.09	6.97	6.90	6.88	
Y.e.	7.47	7.22	7.08	7.03	7.08	
L.pl.	7.28	7.18	7.10	7.03	6.99	
S.tm.	7.27	7.15	7.07	7.01	6.98	

Tab. 20: Werte der extrazellulären Salmonellenzahl, gemittelt aus den Tagen 5, 13 und 20 aller Gruppen (log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
S.tm./ml	7.27	6.08	5.41	5.28	5.68	0.03 - 0.04

Tab. 21: Neomycinabsterbekurve (log Werte)

Minuten	0	30	60	90	120	Std. Abw.
S.tm./ml	7.11	6.86	5.46	4.67	4.38	0.03 - 0.05

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALEKSIĆ, S., R. ROHDE u. V. ALEKSIĆ
Serologische Verwandtschaft der Fimbrienantigene bei
Salmonella Subgenus I - Yersinia enterocolitica einer-
seits und Salmonella Subgenus II-Arizona (=Salmonella
Subgenus III) andererseits
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 241, 418-426 (1978)
2. ANGERMANN, C.R. u. T.K. EISENSTEIN
Correlation of the duration and magnitude of protection
against Salmonella infection afforded by various
vaccines with antibody titers
Infect. Immun. 27, 435-443 (1980)
3. ARNDT, J.
Erfahrungen mit der nichterregerspezifischen Stimulierung
der Abwehrmechanismen in der Kleintierpraxis
Prakt. Tierarzt 63, 372-379 (1982)
4. BARBER, Cella u. E. EYLAN
Heterologous protections in experimental Salmonellosis
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 230, 452-457 (1975)
5. BARBER, Cella u. E. EYLAN
Cross protection induced in mice by immunization with
proteins of related bacteria species
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 234, 46-52 (1976)
6. BAUGHN, R.E. u. P. BONVENTRE
Phagocytosis and intracellular killing of Staph. aureus
by normal peritoneal macrophages
Infect. Immun. 12, 346-352 (1975)
7. BECKER, L.J. u. J.A. RUDBACH
Altered antibody responses in mice treated with toxins
for macrophages
J. Reticuloendothel. Soc. 25, 443-454 (1979)

8. BEELEN, R.H.J. u. D.M.FLUITSMA
What is the relevance of exudate-resident
macrophages ?
Immunobiol. 161, 266-273 (1982)
9. BESREDKA, A.
Die lokale Immunisierung
Joh. Ambrosius Barth, Leipzig (1926)
zit. nach SCHULZE, H. (1972)
10. BLANDEN, R.V., G.B. MACKANESS u. F.M. COLLINS
Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid
J. Exp. Med. 124, 585-600 (1966)
11. BLANDEN, R.V., M.J. LEFFORD u. G.B. MACKANESS
The host response to Calmette-Guérin bacillus
infection in mice
J. Exp. Med. 129, 1079-1101 (1969)
12. BLANDEN, R.V., A.J. HAPPEL, R.C. DOHERTY u. R.M. ZINKER-
NAGEL
Lymphocyte-macrophage interactions and macrophage
activation in the expression of antimicrobial
immunity in-vivo
in: Immunobiology of the Macrophages. Hrsg. von
D.S. Nelson, Academic Press, New York (1976).
S. 367-400
13. BLOCK, L., A. GEORGOPOULOS, P. MAYER u. J. DREWS
Nonspecific resistance to bacterial infections enhancement
by Ubiquinone -8-
J. Exp. Med. 148, 1228-1240 (1978)
14. BLOCKSMA, Nanne, H. ETTEKOVEN, H.F. HOFHUIS, Lucretia van
NOOKLE-JANSEN, M.J. de REUVER, J.G. KREEFTENBERG u.
J.M. WILLERS
Effects of Lactobacilli on parameters of nonspecific
resistance in mice
Med. Microbiol. Immunol. 170, 45-53 (1981)

15. BLUMENSTOCK, E. u. K. JANN
Natural resistance of mice to *S. tm.*: Bactericidal activity and chemiluminescence response of murine peritoneal macrophages
J. Gen. Microbiol. 125, 173-183 (1981)
16. BRADE, V.
Die Sekretion von Mediatoren der Entzündung und der antimikrobiellen Abwehr durch Makrophagen
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 247, 259-275 (1980)
17. BRANDIS, H.
Über die Paramunität (Depressionsimmunität)
Ergeb. Hyg. Bakt. 28, 141-197 (1954)
18. BRILES, D.E., Joyce LEHMEYER u. Colynn FORMAN
Phagocytosis and killing of *Salmonella typhimurium* by peritoneal exsudate cells
Infect. Immun. 33, 380-388 (1981)
19. CARROL, M.E.W., P.S. JACKETT, V.R. ABER u. D.B. LOWRIE
Phagolysosome formation, cyclic adenosine 3:5-monophosphate and the fate of *Salmonella typhimurium* within mouse peritoneal macrophages
J. Gen. Microbiol. 110, 421-429 (1979)
20. CARTER, P.B. u. F.M. COLLINS
The route of the enteric infection in normal mice
J. Exp. Med. 139, 1189-1203 (1974)
21. COHN, Z.A.
The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy, future
J. Immunol. 121, 813-816 (1978)
22. COLLINS, F.M.
Vaccines and cell-mediated immunity
Bact. Rev. 38, 371-402 (1974)

23. COLLINS, F.M. u. S.G. CAMPBELL
Immunity to intracellular bacteria
Vet. Imm. Immunopath. 3, 5-66 (1982)
24. COLLINS, F.M., G.B. MACKANESS u. T. BLANDEN
Infection immunity in experimental salmonellosis
J. Exp. Med. 124, 601-619 (1963)
25. COLLINS, F.M. u. M.T. SCOTT
Effect of *Corynebacterium parvum* treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice
Infect. Immun. 9, 863-869 (1974)
26. CORBEL, M.J.
Stimulation of protective immunity to *Salmonella*-Kauffmann-White Group N Serotypes by *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* antigens
Brit. Vet. J. 131, 625-626 (1975)
27. CUFFINI, Annamaria, Nicola A. CARLONE u. G. FORNI
Bacterial phagocytosis of macrophages from Lipopolysaccharid responder and nonresponder mouse strains
Infect. Immun. 28, 762-765 (1980)
28. DAVIES, R. u. J. KOTLARSKI
The role of thymus-derived-cells in immunity to *Salmonella* infection
Ajebak 54, 221-236 (1976)
29. DICKEL, H.
Zur Bekämpfung der Salmonellose in Kälbermastbeständen
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 320-324 (1976)
30. DUGUID, J.P., M.R. DAREKAR u. D.W.F. WHEATER
Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*
Med. Microbiol. 9, 459-473 (1976)

31. EDELSON, P.J. u. Z.A. COHN

5'-Nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory populations

J. exp. Med. 144, 1581-1595 (1976)

32. FRERKING, H.

Erfahrungen mit der medikamentellen Stimulierung der nichterregerspezifischen Abwehrmechanismen in der Rinderpraxis

Prakt. Tierarzt 63, 364-368 (1982)

33. van FURTH, R.

Current view on the Mononuclear Phagocyte System

Immunobiol. 161, 178-185 (1982)

34. van FURTH, R., van ZWET u. P.C.J. LEIJH

In-vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes

in: Handbook of Experimental Immunology, Vol. 2, "Cellular Immunology". Hrsg. von D.M. Weir, 3. Ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford (1978). S. 32.1 - 32.19

35. FURNESS, G.

Interaction between Salmonella typhimurium and phagocytic cells in cell culture

J. Infect. Dis. 12, 272-277 (1958)

36. GERMANIER, R.

Immunity in experimental Salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of Salmonella typhimurium

Infect. Immun. 5, 792-797 (1972)

37. GOLDMAN, R., Z. BAR-SHAVIT u. A. RAZ

Functional similarity and diversity in peritoneal macrophage populations induced in vivo by various irritants

Adv. exp. med. biol. 121A, 323-332 (1980)

38. GRASCHEL, D., C.M.S. PAAS u. B.S. ROSENBERG
Inherited resistance in mouse typhoid. 1. Some
factors which affect the survival of infected mice
J. Reticuloendothel. Soc. 7, 484-499 (1970)
39. HAHN, H.
Mobilization of mononuclear phagocytes in cellular
immunity to facultative intracellular bacteria
in: Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection
and Pathology. Hrsg. von R. van Furth, Blackwell
Scientific Publication, Oxford (1975). S. 617-629
40. HAHN, H. u. S.H.E. KAUFMANN
T-Lymphocyte-macrophage interactions in cellular
antibacterial immunity
Immunobiol. 161, 361-368 (1982)
41. HAMMERSCHMIDT, W.
Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica*
Vet. med. Diss. Berlin (1983)
42. HARRINGTON-FOWLER, Linda u. M.S. WILDER
Fate of *Listeria monocytogenes* in murine peritoneal
macrophage subpopulations
Infect. Immun. 35, 124-132 (1982)
43. HART, P., J.A. ARMSTRONG, C.A. BROWN u. P. DRAPER
Ultrastructural studies of the behaviour of macrophages
toward parasitic mycobacteria
Infect. Immun. 5, 803-807 (1972)
44. HOF, H. u. H. FINGER
Das Problem der oralen Immunisierung
Immun. Infekt. 2, 63-68 (1974)
45. HOHMANN, A., G. SCHMIDT u. D. ROWLEY
Intestinal and serum antibody responses in mice
after oral immunization with *Salmonella*, *E. coli* and
Salmonella-E.coli hybrid strains
Infect. Immun. 25, 27-33 (1979)

46. HOWARD, J.C. u. N.A. MITCHISON
Immunological tolerance
Prog. Allergy 18, 43-96 (1978)
47. HSU, H.S. u. D.R. MAYO
Interactions between macrophages of Guinea pigs
and Salmonellae.
III. Bactericidal actions and cytophilic antibodies
of macrophages of infected Guinea pigs
Infect. Immun. 8, 165-172 (1973)
48. IWATA, K., Y. KANDA u. H. YAMAGUCHI
Electron microscopic study on phagocytosis of
staphylococci by mouse peritoneal macrophages
Infect. Immun. 19, 649-658 (1978)
49. JENKIN, C. u. M.D. BERNACERRAF
In-vitro studies on the interaction between
peritoneal macrophages and strains of Salmonella
and E. coli
J. Exp. Med. 112, 403-417 (1960)
50. JENKIN, C. u. D. ROWLEY
Basis of immunity to typhoid in mice and the
question of cellular immunity
Bact. Rev. 27, 391-404 (1963)
51. JÜRBECK, H.J.A., S.B. SVENSON u. A.A. LINDBERG
Artificial Salmonella vaccines: Salmonella
typhimurium O-antigen-specific Oligosaccharid-
protein conjugates elicit opsonizing antibodies
that enhance phagocytosis
Infect. Immun. 32, 497-502 (1981)
52. KAGNOFF, M.F.
Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic
immune response.
III. Antigen specific serum-mediated suppression of
humoral antibody responses after antigen-feeding
Cell. Imm. 40, 187-203 (1978)

53. KIRCHNER, A.

Eine Untersuchung an weißen Mäusen über die Wirkung der oralen Immunisierung mit hitzeinaktivierten Keimen eines *S. typhimurium*-Stammes auf allgemeine und lokale Immunitätsmechanismen und auf die Entwicklung der Infektionsresistenz

Vet. med. Diss. Berlin (1982)

54. KOHN, H.

Neue Erkenntnisse über Virulenzeigenschaften der Salmonellen

Mh. Vet. Med. 36, 934-937 (1981)

55. KUNIN, C.M., M.V. BEARD u. N. HALMAGYI

Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of *E. coli* and other enterobacteriaceae

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 160-166 (1962)

56. LEFÈVRE, M.E., R. HAMMER u. D.D. JOEL

Macrophages of mammalian small intestine: A review

J. Reticuloendothel. Soc. 26, 553-556 (1979)

57. LEIJH, P.C.J. u. R. van FURTH

Membrane stimulation and intracellular killing by monocytes

Immunobiol. 161, 345-351 (1982)

58. LU, C.J. u. E.R. UNANUE

Ontogeny of murine macrophages: Functions related to antigen presentation

Infect. Immun. 36, 169-175 (1982)

59. Mac DONALD, T.T. u. P.B. CARTER

Cell-mediated immunity to intestinal infection

Infect. Immun. 28, 513-523 (1980)

60. MACKANESS, G.B.

The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activation in vivo

J. Exp. Med. 148, 973-992 (1969)

61. MACKANESS, G.B.
The monocyte in cellular immunity
Seminars in Haematology 7, 172-184 (1970)
62. MACKANESS, G.B.
Resistance to intracellular infection
J. Infect. Dis. 123, 439-445 (1971)
63. MACKANESS, G.B., R.V. BLANDEN u. F.M. COLLINS
Host parasite relations in mouse typhoid
J. Exp. Med. 124, 573-583 (1966)
64. MAIER, T. u. H.C. OELS
Role of macrophages in natural resistance to
Salmonellosis in mice
Infect. Immun. 6, 438-443 (1972)
65. MARCUS, S., D.W. ESPLIN u. D.H. DONALDSON
Lack of bactericidal effects of mouse serum on a
number of common microorganisms
Science 119, 877 (1954)
66. MARECKI, N.M., H.S. HSU u. D.R. MAYO
Cellular and humoral aspects of host resistance in
murine Salmonellosis
Brit. J. Exp. Path. 56, 231-243 (1975)
67. MAYR, A.
Paramunität und Paramunisierung
Zbl. Vet. Med. B, 29, 5-23 (1982)
68. MAYR, A.
Wissenschaftliche Entwicklungen auf dem Gebiet der
medikamentösen Steigerung der nicht antigenspezifischen,
körpereigenen Abwehr
Prakt. Tierarzt 63, 329-341 (1982)

69. MAYR, A., G. BALJER u. M. BÖTTNER
Aktive Schutzimpfung mit heterologen Impfstoffen
Tierärztl. Umschau 35, 560-576 (1980)
70. MEDINA, S., S.I. VAS u. H.G. ROBSON
Effects of monospecific stimulation on the defense
mechanisms of inbred mice
J. Immunol. 114, 1720-1725 (1975)
71. METSCHNIKOFF, E.
Immunität bei Infektionskrankheiten
Gustav Fischer Verlag, Jena (1902)
zit. nach SCHULZE, H.-J. (1972)
72. MEYER, H.
Erfahrungen mit Salmonella-dublin-Lebendimpfstoff zur
oralen Anwendung beim Kalb
Arch. exp. Vet. med. 34, 99-104 (1980)
73. MIAKE, S., K. TAKEYA, T. MATSUMOTO, Y. YOSHIKAI u. K. NOMOTO
Relation between bactericidal and phagocytic activities
of peritoneal macrophages induced by irritants
J. Reticuloendothel. Soc. 27, 421-427 (1980)
74. MUSCHEL, L.H. u. T. MUTO
Bactericidal reaction of mouse serum
Science 123, 62-64 (1956)
75. NELSON, D.S.
Macrophages: Progress and problems
Clin. Exp. Immun. 45, 225-233 (1981)
76. NORTH, R.J.
Opinions - The concept of the activated macrophage
J. Immunol. 121, 806-809 (1978)

77. NORTH, R.J. u. G.B. MACKANESS

Immunological control of macrophage proliferation
in vivo

Infect. Immun. 8, 68-73 (1973)

78. OPPENHEIM, J.J. u. R.C. SEEGER

The role of macrophages in the induction of cell-
mediated immunity in vivo

in: Immunobiology of the Macrophages. Hrsg. von
D.S. Nelson, Academic Press, New York (1976).
S. 112-130

79. PAWSLOWSKY, A.

Heilung des Milzbrandes durch Bakterien und das
Verhalten der Milzbrandbazillen im Organismus

Virchows Arch. path. Anat. 108, 494 (1887)
zit. nach SCHULZE, H.-J. (1972)

80. PETZOLDT, K.

Stimulierung der nichterregerspezifischen Abwehr
durch mikrobielle Immunmodulatoren

Prakt. Tierarzt 63, 356-362 (1982)

81. RAETTIG, H.

Erfahrungen und vergleichende Betrachtungen über die
Erfolge der parenteralen und peroralen Typhusschluck-
impfung

Z. Immunitätsforsch. 108, 165 (1950)

82. RAETTIG, H.

Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikro-
organismen oder ihren Antigenen. 10. Mitteilung: Sero-
logische Primär- und Sekundärantwort nach oraler
Impfung mit *S. typhimurium* Vollantigen im vergleichen-
den Tierexperiment

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 214, 216-230 (1970)

83. RAETTIG, H.

Phagozytose und das System immunkompetenter Zellen
Therapiewoche 45, 6756-6762 (1975)

84. RAETTIG, H.
Nonspecific immunity after oral immunization
Develop. Biol. Stand. 33, 13-18 (1976)
85. RAETTIG, H.
Ein Enterititis-Oralimpfstoff aus 12 hitzeinaktivierten Enterobacteriaceen. 1. Mitteilung: Theoretische und epidemiologische Grundlagen
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 245, 287-300 (1979)
86. RAETTIG, H.
Ein Enterititis-Oralimpfstoff aus 12 hitzeinaktivierten Enterobacteriaceen. 3. Mitteilung: Wirksamkeitsprüfung im aktiven Mäuseschutzversuch
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 250, 511-520 (1981)
87. RAETTIG, H., G. LAUDAHN u. M. MÖLLING
Immunprophylaxe der Kälbersalmonellose durch orale Impfung mit inaktivierten Bakterien
Fortschr. Vet. Med., Heft 17: 9. Kongreßbericht, 176-183 (1972)
88. RAETTIG, H. u. A. MARQUARDSEN
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 11. Mitteilung: Wirksamkeit von Kombinationsimpfstoffen aus Enterobacteriaceen-Vollantigen im Mäuseschutztest
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215, 296-315 (1970)
89. ROANTREE, R.J.
Salmonella O-antigens and virulence
Ann. Rev. Microbiol. 21, 433-466 (1967)
90. ROWLEY, D., M. THÜNI u. H. ISLIKER
Opsonic requirements for bacterial phagocytosis
Nature 207, 210-211 (1965)
91. SAITO, K., M. NAKANO, T. AKIYAMA u. D. USHIBA
Passive transfer of immunity to typhoid by macrophages
J. Bact. 84, 500-507 (1962)

92. SCHLEWINSKI, Elvira, N. GRABEN, Josefina FUNK, E. SAHM u. H. RAETTIG

Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 13. Mitteilung: Persorption und Sekretion von Mikroorganismen im Tierversuch

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 218, 93-104 (1971)

93. SCHON-HEGARD, M.A. u. P.G. HOLT

Improved methods for the isolation of purified mouse peritoneal macrophages

J. Immun. Methods 43, 169-173 (1981)

94. SCHROIT, A.J. u. Ruth GALLILY

Quantitative in vitro phagocytic measurements

J. Immun. Methods 17, 123-130 (1977)

95. SCHULZE, H.-J.

Einfluß der oralen Immunisierung auf die Phagozytosefähigkeit von Peritonealmakrophagen

Med. Diss. Berlin (1972)

96. SCHULZE, H.-J., Christa JASCHINSKY u. H. RAETTIG

Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen: 17. Mitteilung: Zeitkinetik der Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 225, 273-278 (1973)

97. SODERBERG, L.S.F. u. M. SOLOTOROVSKY

Host parasite interactions with macrophages in culture

in: Phagocytes and cellular immunity. Hrsg. von H.H. Gadebusch, CRC-Press, Inc., Florida (1979). S. 101-136

98. SPITALNY, G.
Dissociation of bactericidal activity from other functions of activated macrophages in exsudates induced by Thioglycolate medium
Infect. Immun. 34, 274-284 (1981)
99. STEINBACH, G., M. MEYER u. H. KOCH
Untersuchungen über eine nach oraler Gabe des Salmonella-dublin-Lebendimpfstoffes Bovisal-oral^R Dessau zu beobachtende frühe Schutzphase beim Kalb
Mhefte Vet. Med. 38, 92-96 (1983)
100. SZIEGOLEIT, A.
Sekretorische Immunglobuline und Serumantikörper nach Salmonella typhimurium Infektion der Maus
Z. Immunitätsforsch. 152, 244-250 (1976)
101. TRUDGETT, A. T.A. Mc NEILL u. M. KILLEN
Granulocyte-Macrophage precursor cells and colony-stimulating factor responses of mice infected with Salmonella typhimurium
Infect. Immun. 8, 450-455 (1973)
102. VOLKHEIMER, G.
Persorption
in: Gastroenterologie und Stoffwechsel. Hrsg. von H. Bartelheimer, H. Kühn, V. Becker u. F. Stelzner, Band 2, Thieme, Stuttgart (1972)
103. VRAY, B., M. SAINT-GUILLAN, R. LELOUP u. J. HOEBEKE
Kinetic and morphologic studies of rat macrophage phagocytosis
J. Reticuloendothel. Soc. 29, 307-319 (1981)
104. WAKSMEN, B.H.
Specific and nonspecific suppressor T-cell factors derived from thymic lymphocytes
Cell. Immun. 30, 189-191 (1977)

105. WALDRON, J.A., R.G. HORN u. S. ROSENTHAL

Antigen-induced proliferation of Guinea Pig lymphocytes
in vitro: obligatory role of macrophages in the
recognition of antigen by immun-T-lymphocytes

J. Immunol. 111, 58-64

106. WALKER, W.S.

Functional heterogeneity of macrophages

in: Immunobiology of the Macrophages. Hrsg. von
D.S. Nelson, Academic Press, New York (1976).
S. 91-111

107. WATSON, S.R. u. F.M. COLLINS

Suppressor T-cell production in heavily infected
mice

Immunol. 39, 267-273 (1980)

108. WINER, B.J.

in: Statistical principles in experimental design.
Hrsg. von W. Maydham, A. Shaprio and J. Mc Graw Hill,
2. Ed., Mc Graw Hill, New York (1972)

109. WORLD HEALTH ORGANIZATION

Oral enteric bacterial vaccine

W.H.O. Techn. Rep. Ser. 500 (1972)

110. WOHLFARTH, U.

Versuche zur Steigerung der Infektionsresistenz der
weißen Maus gegen die orale S. typhimurium-Infektion
durch Vorbehandlung mit verschiedenen Y. enteroco-
litica- und E. coli-Stämmen

Vet. med. Diss. Berlin (1983)

111. WOLOSCHAK, G.E. u. T.B. TOMASI

The immunology and molecular biology of the gut
associated immune system

in: Critical Reviews in Immunology, Vol. 4. Hrsg.
von M.Z. Atassi, CRC Press, Florida (1982).
S. 1-18

112. YOSHIDA, E.

Über Immunisierung per os
Arch. Hyg. 69, 21-37 (1909)

113. YOSHIKAI, Y., S. MIAKE, T. MATSUMOTO, K. NOMOTO u. K. TAKEYA

Relationship between non-specific activity of
macrophages and immune responses to *Listeria*
monocytogenes
Immunolog. 40, 295-300 (1980)

114. ZINKERNAGEL, P.M.

Cell-mediated immune response to *Salmonella typhimurium*
infection in mice: Development of non-specific
bactericidal activity against *Listeria monocytogenes*
Infect. Immun. 13, 1069-1073 (1976)

Lebenslauf

- | | |
|----------------|--|
| 21. März 1956 | geboren in Hamburg als Tochter des
Heinrich Schuldt und seiner Frau
Magdalena, geb. Böttcher |
| 1963 - 1967 | Grundschule Rugenbarg in Hamburg |
| 1967 - 1975 | Gymnasium Willhöden in Hamburg |
| 03. Juni 1975 | Abitur |
| 01. April 1976 | Aufnahme des Studiums der Veterinär-
medizin an der Freien Universität Berlin |
| 14. März 1978 | Tierärztliche Vorprüfung an der
Freien Universität Berlin |
| 25. Juni 1981 | Tierärztliche Prüfung an der
Freien Universität Berlin |
| 16. Juli 1981 | Approbation als Tierärztin in Berlin |

Herrn Prof. Dr. Hellmann möchte ich für die Überlassung des
Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung danken.

Herrn Reinhard Meister aus der Fachrichtung Biometrie danke
ich für seine freundliche Unterstützung bei der statisti-
schen Auswertung der Ergebnisse.

Mein Dank gilt ferner allen Institutsmitgliedern für die stets
erwiesene Hilfsbereitschaft - vor allem Wolfgang.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen